



Rôle de la CK2 dans l'activation de la réponse immunitaire induite par les molécules allergisantes et son lien avec Nrf2

Marie De Bourayne

► To cite this version:

Marie De Bourayne. Rôle de la CK2 dans l'activation de la réponse immunitaire induite par les molécules allergisantes et son lien avec Nrf2. Toxicologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA114823 . tel-01359173

HAL Id: tel-01359173

<https://theses.hal.science/tel-01359173>

Submitted on 2 Sep 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

DISCIPLINE : TOXICOLOGIE

ANNÉE 2014 - 2015

SÉRIE DOCTORAT N° 1330

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 09 Juillet 2015

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD

PAR

Marie de BOURAYNE

Rôle de la CK2 dans l'activation de la réponse immunitaire induite par les molécules allergisantes et son lien avec Nrf2

Composition du jury :

Pr Saadia Kerdine-Römer	Directrice de Thèse	Professeur des Universités-INSERM UMR-S 996 Université Paris-Sud
Pr Christian Poüs	Président du Jury	Professeur des Universités-INSERM UMR-S 1193 Université Paris-Sud
Dr Nuala Mooney	Rapporteur	DR CNRS-INSERM UMR-S 1160 Université Paris-Diderot
Pr Laurent Vernhet	Rapporteur	Professeur des Universités-INSERM UMR 1085 Université Rennes-1
Dr Elena Giménez-Arnau	Examineur	CR CNRS-CNRS UMR 7177 Université de Strasbourg
Dr Joël Raingeaud	Examineur	CR CNRS-CNRS UMR 8126 Université Paris-Sud

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	5
LISTE DES FIGURES.....	15
LISTE DES TABLEAUX	17
LISTE DES ABREVIATIONS	19
AVANT-PROPOS.....	23
INTRODUCTION	27
I. Immunité cutanée	29
1. Structure cutanée.....	29
1.1. L'épiderme.....	30
1.2. Le derme.....	32
1.3. L'hypoderme.....	33
2. Immunité cutanée : acteurs et effecteurs.....	34
2.1. Les kératinocytes, sentinelles immunitaires	35
2.2. Les cellules dendritiques : à l'interface entre l'immunité innée et adaptative.....	37
2.2.1. Les cellules de Langerhans	38
2.2.2. Les cellules dendritiques dermales	41
2.2.3. Les cellules dendritiques inflammatoires de la peau	43
2.2.4. Les cellules dendritiques tolérogènes	44
2.3. Les lymphocytes T conventionnels et non conventionnels.....	46
2.3.1. Les lymphocytes T conventionnels.....	46
2.3.1.1. Les lymphocytes T mémoires	46
2.3.1.2. Les lymphocytes T régulateurs	48
2.3.2. Les lymphocytes T non conventionnels.....	49
2.4. Les macrophages cutanés	50
2.5. Les mastocytes	51
2.6. Les fibroblastes.....	52
3. Détection des signaux de danger et déclenchement de la réponse immunitaire cutanée ..	52
3.1. Qu'est-ce qu'un signal de danger?.....	53
3.1.1. Les DAMPs extracellulaires ou DAMPs dérivés de la MEC	54
3.1.2. Les DAMPs intracellulaires	54
3.2. La reconnaissance des signaux de danger.....	56
3.2.1. Les récepteurs Toll-like.....	56

3.2.2.	Les récepteurs NOD-like	59
3.2.3.	Les récepteurs de la famille des lectines de type C.....	63
3.2.4.	Les RLR et les ALR	63
II.	L'eczéma allergique de contact	65
1.	Les molécules allergisantes cutanées.....	65
1.1.	Les différents types d'haptènes	66
1.1.1.	Les haptènes vrais	67
1.1.2.	Les pré-haptènes	68
1.1.3.	Les pro-haptènes	70
1.2.	Pénétration percutanée des haptènes.....	71
1.3.	Liaison des haptènes aux protéines cutanées environnantes.....	72
1.3.1.	Les liaisons de covalence	72
1.3.2.	Les liaisons de coordination	73
2.	Physiopathologie de l'eczéma allergique de contact : la phase de sensibilisation	77
2.1.	Reconnaissance des haptènes par l'immunité innée	77
2.1.1.	Orchestration de la réponse immunitaire innée moléculaire : activation des voies de signalisation.....	77
2.1.2.	Orchestration de la réponse immunitaire innée cellulaire	78
2.1.3.	Signalisation par libération de médiateurs moléculaires	80
2.2.	Rôle des DC dans l'EAC : de l'immunité innée à l'immunité adaptative	82
2.2.1.	Activation des DC.....	82
2.2.2.	Capture antigénique.....	84
2.2.3.	Migration des DC et transport des antigènes.....	84
2.2.4.	Présentation antigénique	86
2.3.	Génération d'une réponse T spécifique de l'haptène	88
2.3.1.	La synapse immunologique, un dialogue de haute importance	88
2.3.1.1.	L'interaction CMH/TCR.....	88
2.3.1.2.	Les molécules de co-stimulation et de co-inhibition.....	91
2.3.1.3.	La sécrétion de cytokines par la DC oriente la polarisation lymphocytaire	97
2.3.2.	Génération des lymphocytes T spécifiques de l'haptène.....	99
2.3.2.1.	Génération de LT effecteurs.....	99
2.3.2.2.	Génération de LT mémoires.....	102
2.4.	Rôle des Lymphocytes B	103
3.	Physiopathologie de l'eczéma allergique de contact : la phase d'éllicitation.....	104

3.1.	Le recrutement précoce des T _{EFF}	105
3.2.	Rôle des chimiokines et cytokines dans le recrutement des T _{EFF}	106
3.3.	L'amplification de l'inflammation.....	107
4.	La régulation de l'eczéma allergique de contact.....	108
4.1.	Régulation par l'environnement cutané	108
4.2.	Les cellules T régulatrices conventionnelles	109
4.2.1.	Les LT régulateurs CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	109
4.2.2.	Les LT CD8 ⁺ suppresseurs.....	110
4.3.	Les cellules T régulatrices non conventionnelles	111
4.3.1.	Les lymphocytes T $\gamma\delta$	111
4.3.2.	Les lymphocytes NKT.....	112
4.4.	Les lymphocytes B régulateurs.....	112
5.	Diagnostic et traitement de l'eczéma allergique de contact	113
5.1.	Signes cliniques et histologiques de l'eczéma allergique de contact.....	113
5.2.	Diagnostic de l'eczéma allergique de contact	114
5.2.1.	Le diagnostic.....	114
5.2.2.	Les tests utilisés.....	116
5.3.	Le traitement de l'eczéma allergique de contact.....	117
III.	La voie Nrf2/Keap1	119
1.	Allergisants cutanés et stress oxydant	119
1.1.	Le stress oxydant, un équilibre finement régulé.....	119
1.2.	Les Molécules allergisantes induisent un stress oxydant.....	121
2.	La voie Nrf2/Keap1	122
2.1.	Le facteur de transcription Nrf2	123
2.2.	Keap1, le senseur endogène de Nrf2	125
2.2.1.	Structure de Keap1	125
2.2.2.	Le mécanisme d'interaction de Keap1 et Nrf2.....	126
3.	Les séquences Antioxydant Response Element et gènes cibles de Nrf2.....	127
3.1.	Les séquences antioxydant response element	127
3.2.	Les différents systèmes antioxydants	129
3.2.1.	Les antioxydants non- enzymatiques	129
3.2.2.	Les antioxydants enzymatiques : rôle crucial de Nrf2.....	130
3.2.2.1.	Les enzymes antioxydantes.....	131
3.2.2.2.	Les enzymes de phase II	134

4.	Les molécules modulatrices de la voie Nrf2/Keap1	135
4.1.	Les activateurs de la voie Nrf2/Keap1	135
4.2.	Les molécules inhibitrices de Nrf2.....	140
5.	Mécanismes d'activation de la voie Nrf2/ Keap1.....	141
5.1.	Le modèle hinge and latch	141
5.2.	Le changement conformationnel de Keap1 et sa dissociation d'avec Cul3	142
5.3.	Le modèle de conformation cyclique	143
5.4.	L'oxydation des cystéines de Nrf2	145
5.5.	Autres mécanismes d'activation de Nrf2	145
5.6.	Voies d'activation de Nrf2	145
5.6.1.	Rôle de la phosphorylation de Nrf2.....	145
5.6.1.1.	La phase précoce d'activation	145
5.6.1.2.	La phase tardive de phosphorylation de Nrf2	148
5.6.2.	Modification post-traductionnelles de Nrf2.....	150
5.6.2.1.	L'acétylation et désacétylation de Nrf2	150
5.6.2.2.	Régulation par les microRNAs	151
5.6.3.	Modifications de Keap1 et les conséquences sur l'activation de Nrf2.....	151
5.6.4.	Les protéines partenaires de Keap1	152
5.6.5.	Les protéines partenaires de Nrf2	154
6.	Nrf2 & pathologies inflammatoires.....	155
6.1.	Rôle de Nrf2 dans l'immunité innée et la réponse inflammatoire.....	155
6.1.1.	Nrf2 régule les médiateurs de l'inflammation	155
6.1.2.	Interactions entre Nrf2 et les voies de signalisation de l'inflammation	157
6.1.3.	Nrf2 et maladies inflammatoires.....	158
6.2.	Nrf2 dans la réponse immunitaire adaptative	161
6.2.1.	Implication de Nrf2 dans la production de cytokines clés dans l'orientation d'une réponse immunitaire par la DC	161
6.2.2.	Implication de Nrf2 dans l'activation des LT et la sécrétion de cytokines par les lymphocytes T.....	162
6.2.3.	Implication de Nrf2 dans l'inflammation cutanée d'origine allergique	163
	PRESENTATION DU TRAVAIL	167
	RESULTATS.....	171
	ARTICLE.....	173
	RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	217

1. Introduction.....	219
2. Matériel et Méthodes	221
2.1. Modèle cellulaire : lignée cellulaire THP1	221
2.2. Traitement des cellules par les différentes molécules chimiques	221
2.3. Déphosphorylation des protéines par la lambda phosphatase	222
2.4. Analyse protéique par Western blot	222
2.5. Transfection cellulaire	223
2.6. Co-immunoprécipitation	223
2.7. Reverse Transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)	224
2.8. Sondes ARE biotinylées	224
2.9. Génération des DC murines issues de la moelle osseuse (BMDC)	224
2.10. Transfert adoptif de cellules dendritiques	225
2.11. Marquage au PKH26 et cytométrie en flux	225
3. Résultats	227
3.1. Nrf2 existe sous une forme phosphorylée	227
3.1.1. La Lambda Phosphatase recombinante entraîne la disparition de la bande de plus haut poids moléculaire de Nrf2.....	227
3.1.2. L'acide okadaïque exacerbe la phosphorylation de de Nrf2	228
3.2. La protéine kinase CK2 est impliquée dans l'activation de la voie Nrf2/Keap1	230
3.2.1. CK2 ne diminue pas significativement l'accumulation de Nrf2.....	230
3.2.2. CK2 contrôle l'expression génique de gènes cibles de Nrf2.....	232
3.3. L'inhibition de la CK2 dans les DC murines conduit à une exacerbation de la réponse inflammatoire (réalisé en collaboration avec Zeina El Ali)	233
3.4. La kinase JNK contrôle-t-elle l'accumulation de Nrf2 ?	238
3.5. Nrf2 est lié à Keap1 en réponse au CinA	240
3.6. Nrf2 et c-Jun se fixent aux séquences ARE en réponse au CinA	241
3.7. Nrf2 n'est pas fixé à c-Jun en réponse au CinA mais en réponse au DNCB.....	242
3.8. Le SP600125 diminue l'activité de la CK2	244
3.9. L'extinction spécifique de JNK par siRNA n'altère pas la voie Nrf2.....	246
DISCUSSION	249
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES.....	261
BIBLIOGRAPHIE.....	267
ANNEXE 1 : COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	304
ANNEXE 2 : ARTICLE PUBLIÉ DANS ENCYCLOPEDIA OF INFLAMMATORY DISEASES.....	308

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie cutanée	29
Figure 2 : Structure de l'épiderme	30
Figure 3 : Effecteurs du système immunitaire dans la peau humaine.....	35
Figure 4 : Les kératinocytes, sentinelles de l'immunité	36
Figure 5 : Interaction entre Treg et tDC	45
Figure 6 : Le rôle des DAMPs dans l'induction d'une réponse immunitaire adaptative.....	59
Figure 7 : Voies de signalisation des TLR et NLR	62
Figure 8. L'activation des différents types d'haptènes	67
Figure 9. Exemples de groupes électrophiles fonctionnels retrouvés sur les haptènes et qui réagissent avec les résidus nucléophiles des protéines.	68
Figure 10. L'oxydation du <i>d</i> -limonène conduit à divers produits réactifs allergisants	69
Figure 11. Oxydation de l'alcool cinnamique en aldéhyde cinnamique	70
Figure 12. Les liaisons covalentes	72
Figure 13. Réactions principales entre les haptènes et les protéines.....	73
Figure 14. Exemples de liaisons de coordination effectuées par les métaux	74
Figure 15. Mécanismes d'activation de la réponse cellulaire par les haptènes	76
Figure 16. Activation directe et indirecte des voies de signalisation du système immunitaire inné....	78
Figure 17. Médiateurs de la réponse immune cutanée	81
Figure 18. Activation des DC par les molécules allergisantes	82
Figure 19. Les étapes clé de la migration des DC vers les ganglions lymphatiques	86
Figure 20. Présentation des Ag par les DC	87
Figure 21. La synapse immunologique entre DC et LT	89
Figure 22. Reconnaissance des haptènes par les LT	91
Figure 23. Les principales molécules de co-stimulation dans le priming des LT naïfs par les DC.....	94
Figure 24. Molécules co-inhibitrices de la famille CD28-B7.....	97
Figure 25. Les différentes sous-populations de LT.....	98
Figure 26. Différenciation, activation et interactions entre les différentes sous-populations de LT .	100
Figure 27. Expansion et différenciation des LT CD8+ en LT effecteurs et mémoires après l'interaction avec des DC activées par un antigène	102
Figure 28. Lésions de l'eczéma allergique de contact.....	114
Figure 29. (A) Patch-tests (B) interprétation du patch test.....	116
Figure 30. Origine des espèces réactives de l'oxygène	120
Figure 31. Structure et domaines fonctionnels de Nrf2.....	124
Figure 32. Structure et domaines fonctionnels de Keap1.....	126
Figure 33. Modèle spéculatif d'interaction entre Nrf2 et Keap1	127
Figure 34. Synthèse du glutathion par la GCS.....	133
Figure 35. Le système thiorédoxine-thiorédoxine réductase	133
Figure 36. Réaction de l'addition de Michael et exemples d'accepteurs de Michael	138
Figure 37. Interaction des quinones avec Keap1	138
Figure 38. Mécanisme d'interaction du sulforaphane avec Keap1.....	139
Figure 39. Mécanismes de stabilisation de Nrf2	143
Figure 40. Modèle conformationnel cyclique du complexe Nrf2/Keap1.....	144
Figure 41. La phase précoce et la phase tardive de l'activation de Nrf2	149

Figure 42. La bande de haut poids moléculaire de Nrf2 est phosphorylée	228
Figure 43. La bande de haut poids moléculaire de Nrf2 est phosphorylée	229
Figure 44. La CK2 ne contrôle pas l'accumulation de Nrf2	231
Figure 45. La CK2 ne phosphoryle pas Nrf2	231
Figure 46. La CK2 contrôle l'accumulation des gènes cibles de Nrf2.....	232
Figure 47. La CK2 contrôle la réponse inflammatoire.....	234
Figure 48. La CK2 semble contrôler l'expression des ARNm de cytokines pro-inflammatoires	236
Figure 49. Les BMDC traitées par le CX puis injectées aux souris sont retrouvées au niveau des oreilles	237
Figure 50. La kinase JNK semble contrôler l'accumulation de Nrf2.....	239
Figure 51. D'autres kinases régulent l'accumulation de Nrf2.....	240
Figure 52. Nrf2 est complexé à Keap1 en absence et en présence de JNK.....	241
Figure 53. Nrf2 et Phospho c-Jun fixent les séquences ARE en réponse au CinA.....	242
Figure 54. Nrf2 n'est pas complexé à c-Jun en réponse au CinA	243
Figure 55. Nrf2 est complexé à c-Jun en réponse au DNCB.....	244
Figure 56. Le SP600125, inhibiteur de JNK inhibe l'activité de la CK2	245
Figure 57. L'extinction de JNK par siRNA n'altère pas l'accumulation de Nrf2.....	246
Figure 58. L'extinction de JNK par siRNA n'altère pas les gènes cibles de Nrf2	247
Figure 59. L'extinction de JNK par siRNA ne diminue pas l'activité de la CK2 comparé au siRNA contrôle	248
Figure 60. Bilan & Perspectives.....	266

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Phénotype des LCs murines et humaines	39
Tableau 2 : Les marqueurs phénotypiques des DC cutanées murines et humaines	42
Tableau 3 : Les marqueurs phénotypiques des différentes DC inflammatoires cutanées	44
Tableau 4 : Les populations de LT mémoires	48
Tableau 5 : Nature et sources des DAMPs extracellulaires	54
Tableau 6 : Nature et sources des DAMPs intracellulaires	55
Tableau 7 : Les différents ligands des TLR humains.....	57
Tableau 8. Exemples de fragrances montrées expérimentalement comme étant pré- et/ou pro-haptènes.....	69
Tableau 9. Diagnostic différentiel entre l'eczéma de contact et la dermatite d'irritation	115
Tableau 10. Les gènes régulés par Nrf2	136

LISTE DES ABREVIATIONS

A

ADN: Acide DésoxyriboNucléique
 Ag: Antigène
 AKR: AldoKétoRéductases
 AMP: Peptide Anti-Microbien
 AP-1: Activated Protein-1
 ARE: Antioxidant Response Elements
 As: Arsenic
 ASC: Apoptosis-associated Speck-like protein
 containing a Caspase recruitment domain
 ATF: Activating Transcription Factor

B

Bach: Bric-a-brac/Tram-track/Broad complex
 (BTB) And CNC Homolog
 BHA: tertio-Butylhydroxyanisole
 BMDC: Bone-Marrow Dendritic Cells
 BPCO: Broncho-Pneumopathie Chronique
 Obstructive
 Breg: LB régulateurs
 BTB: Broad complex Tramtrack and Bric-a-Brac
 BTLA: B and T Lymphocyte Attenuator
 BVR: Biliverdine Réductase
 bZIP: basique leucine zipper

C

CAT: Catalase, 115
 CBP: CREB (cAMP Responsive Element Binding
 Protein)-Binding Protein
 CCL: CC-chemokine Ligand
 Cd: Cadmium
 cDC: Cellule Dendritique conventionnelle
 CinA: Cinnamaldéhyde
 CK2: Caséine Kinase 2 - Protéine Kinase CK2
 CLA: Cutaneous Lymphocyte Antigen
 CLR: Récepteurs aux Lectines de type C
 CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
 CNC: Cap 'n' Collar
 Co: Cobalt
 CO: Monoxyde de carbone
 Cox2: Cyclo-oxygénase 2

CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène
 CTL: LT cytotoxique
 CTLA4: Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4
 CTLA-4: Cyotoxic T Lymphocyte Associated
 protein 4
 Cul3/Rbx1: Cullin 3/Ring box 1
 CXCL: CXC-chemokine Ligand
 CYP450: Cytochrome P450

D

DAMP: Danger-Associated Molecular Patterns
 DC: Cellules Dendritiques
 DC-SIGN: DC-specific intercellular adhesion
 molecule-3 (ICAM-3)-grabbing non-integrin
 DDC: Cellules Dendritiques Dermales
 DEM: Diéthylmaléate
 DETC: Cellules Dendritiques Epidermales T ;
 Dendritic Epidermal T cells
 DGR: Double Glycine Repeat/Kelch Voir
 dLN: draining Lymph Node
 DMF: Diméthyl Fumarate
 DNBS: acide Dinitrobenzène Sulfonique
 DNFB: Dinitrofluorobenzène
 DNTB: Dinitrothiocyanobenzène
 DT: Toxine Diphtérique

E

EAC: Eczéma Allergique de Contact
 ECVAM: European Centre for the Validation of
 Alternative Methods
 ERA: Espèces Réactives de l'Azote
 ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase
 ERO: Espèces Réactives de l'oxygène

F

Fas-L: Fas-Ligand
 FLG: Filaggrine
 FLIM: Fluorescence Lifetime Imaging
 Microscopy
 FoxP3: Forkhead box P3
 FRET: Förster Resonance Energy Transfer

G

GCL: Glutamate-Cystéine Ligase
GCLC: Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic
GCLM: Glutamate-Cysteine Ligase Modifier
GITR: Glucocorticoid-Induced TNFR
GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPx: Glutathion Peroxidase
GR: Glutathion Réductase
GSH: Glutathion
GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 beta
GST: Glutathione S-Transférase

H

HCLAT: Human-Cell Line Activation Test
HDAC: l'Histone Désacétylase
Hg: Mercure
HLA: Human Leukocyte Antigen
HNE: Hydroxynonéal
HO-1: Hème Oxygenase-1
HS: Hypersensibilité
HSC: HyperSensibilité de Contact
HSR: Hypersensibilité retardée
HVEM: Herpes Virus Entry Mediator

I

ICOS: Inducible T cell Co-Stimulator
IDO: Indoleamine 2,3 DiOxygenase ;
Indoleamine 2,3-DiOxygenase
IFN: Interféron
Ig: Immunoglobuline
IKK β : Inibitor Kappa B (I κ B) Kinase beta
IL: Interleukine
ILT: Ig-Like Transcript
iNKT: Natural killer T invariant ; NKT invariants
iNOS: inducible Monoxyde d'azote Synthase
IRAK: Interleukin-1 Receptor Associated Kinases
IRF-3: Interferon Regulatory Factor-3
ITC: Isothiocyanates
IVR: InterVening Region

J

JNK: c-Jun N-terminal kinases

K

KC: Kératinocytes
Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1
KGF: Keratinocyte Growth Factor ,
KLH: Keyhole Limpet Hemocyanin

L

LAG-3: Lymphocyte Activation Gene-3
LB: Lymphocytes B
LC: Cellules de Langerhans ,
LFA-3: Lymphocyte Function associated Antigen-3
LPS: Lipopolysaccharide
LT: Lymphocytes T
LZT: Low Zone Tolerance

M

Ma: Macrophages
MA: Maladie d'Alzheimer
MAf: musculoaponeurotic Fibrosarcoma
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases
MARE: Maf Recognition Element
MCP-1: Monocyte-Chemotactic Protein 1
MDR: Multi Drug Resistance
MEC: Matrice Extra-Cellulaire
MEST: Mouse Ear Swelling Test
MIP-1: Macrophage Inflammatory Protein-1
miR: microRNA
MMP: Matrix MetalloProtéinase
MoDC: DC humaines issues de monocytes
MP: Maladie de Parkinson
MRP: Multi Resistance Protein
MyD88: Myeloid Differentiation factor 88

N

NAC: N-acétylcystéine
Neh: Nrf2 ECH homology
NES: Nuclear Export Sequence
NF-E2: Nuclear Factor Erythroid 2
NF- κ B: Nuclear Factor kappa B
Ni: Nickel
NK: Natural Killer
NKT: Natural Killer T
NLR: Nod-Like Receptor

NLS: Nuclear Localization Sequence

NO: Monoxyde d'azote

NOD: Nucleotide-binding oligomerization

NOX: NAD(P)H oxydase

NQO1: NAD(P)H; Quinone Oxidoréductase-1

Nrf2: Nuclear Factor erythroid-2-Related
Factor 2

nTreg: Treg naturels

O

ONOO⁻: Peroxynitrite

P

PAMP: Pathogen-Associated Molecular
Patterns

PD-1: Programmed cell Death-1

pDC: Cellule Dendritique plasmacytoïde

PDL-1: Programmed cell Death Ligand 1

PGE2: Prostaglandines E2

p-i concept: pharmacological interaction
concept

PKC: Protéine Kinase C

PM: Poids Moléculaire

PN: Polynucléaire Neutrophile

pPD: para-PhénylèneDiamine

Prdx: Peroxyrédoxine

PRR: Pattern Recognition Receptor

R

RA: Acide Rétinoïque

RANTES: Regulated on Activation, Normal T
cell Expressed and Secreted

RE: Reticulum Endoplasmique

RLR: Retinoic acid-inducible gene-I Receptor

ROAT: Repetead Open Application Test

ROR: RAR - Related Orphan Receptor

S

SMX: Sulfaméthoxazole

SOD: Superoxide Dismutase

STAT: Signal Transducer and Activator of
Transcription

STCA: Sulfoxythiocarbamate

T

t-bet: T Box Transcription

tBHQ: tert-Butylhydroquinone

T_{CM}: LT centraux mémoires ; Lymphocyte T
centraux mémoires

TCR: T Cell Receptor

tDC: Cellule dendritique tolérogène

T_{EFF}: Lymphocyte T effecteur

T_{EM}: Lymphocyte T mémoire effecteur

Tfh: Lymphocyte T follicular helper

TGF: Transforming Growth Factor

Th: T helper

TIM: T cell Ig domain and Mucine domain

TIR: Toll/IL-1 Receptor homology domain

TIRAP: TIR domain containing Adapter
Protein)/Ma1

TLR: Toll Like Receptor

T_{MEM}: Lymphocyte T mémoire

TNCB: Trinitrochlorobenzène

TNF: Tumor Necrosis Factor

TNF-R: Récepteur au TNF

TNFRSF: SuperFamille des Récepteurs du TNF

TNP: TriNitroPhényl

TRAF: Tumor necrosis factor Receptor-
Associated Factors

TRAM: Trif-Related Adapter Molecule

TRE: TPA (12-O-tétradécanoylphorbol 13-
acétate) Response Element

Treg: Lymphocyte T régulateur

Trif: TIR domain containing adapter inducing
IFN- γ

T_{RM}: Lymphocyte T résidents mémoires

Trx1: Thioredoxine 1

TrxR: Thiorédoxine Réductase

TSLP: Thymic Stromal Lymphopoietin

U

UGT: Uridine diphospho (UDP)- Glucuronosyl
Transférase

UV: Ultra-Violets

V

VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule-1

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

AVANT-PROPOS

Avant-propos

Les réactions allergiques sont classées au quatrième rang des maladies mondiales selon l'Organisation Mondiale de la Santé. Il s'agit d'un réel problème de santé publique, dont le coût socio-économique est estimé à 5 milliards de dollars par an aux Etats-Unis.

L'eczéma allergique de contact, ou hypersensibilité de contact, est une réaction d'hypersensibilité retardée. Il s'agit d'une réaction inflammatoire aiguë survenant suite à l'exposition répétée de la peau avec une molécule allergisante présente dans l'environnement quotidien ou professionnel. Les composés chimiques responsables de l'HSC sont majoritairement des haptènes, molécules de faible poids moléculaire qui ne deviennent immunogènes qu'après association stable avec des protéines. Les cellules dendritiques (DC) cutanées jouent un rôle primordial dans la génération d'un EAC : dès le premier contact avec la molécule allergisante, les DC prennent en charge l'haptène et migrent jusqu'aux ganglions drainants pour induire une réponse lymphocytaire T primaire spécifique de l'haptène.

Les molécules allergisantes activent de nombreuses voies de signalisation dans les DC, leur permettant d'assurer leurs fonctions d'endocytose, de migration et de présentation de l'haptène aux lymphocytes T (LT).

Un peptide array réalisé au sein de notre équipe a mis en évidence que les molécules allergisantes telles que le sulfate de nickel (NiSO_4) et le 2,4-dinitrochlorobenzène (DNCB) activent fortement la protéine kinase CK2 dans la DC. La CK2 est une kinase ubiquitaire et constitutivement active impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la régulation du cycle cellulaire. **Le premier objectif de ce travail a été d'étudier le rôle de la CK2 dans l'acquisition d'un phénotype mature des DC et dans la génération d'une réponse lymphocytaire T en réponse au NiSO_4 et au DNCB.**

Par ailleurs, les molécules allergisantes génèrent un stress chimique détecté par le facteur de transcription Nrf2, voie majeure de détoxification des xénobiotiques. Il a récemment été démontré dans notre équipe que Nrf2 contrôle l'inflammation d'origine allergique. **Le deuxième objectif de ce travail a été d'identifier si les kinases activées par les molécules allergisantes dans la DC participent à l'activation de Nrf2.**

INTRODUCTION

I. Immunité cutanée

1. Structure cutanée

La peau, organe le plus étendu et le plus lourd du corps humain, est la première barrière de protection de notre organisme. Avec sa superficie de près de 2 m² et son poids de 5 kg, elle représente environ 16 % de la masse corporelle. Elle constitue un tissu de revêtement en continuité avec les muqueuses et une barrière physique contre l'environnement extérieur. L'immuno-surveillance d'un organe de cette taille autant exposé aux agressions constitue un défi pour les cellules sentinelles et effectrices de l'immunité (Nestle *et al.*, 2009). Le maintien de l'homéostasie immunitaire dans la peau repose sur un équilibre finement régulé ; une rupture de celui-ci contribue à la pathogénèse de maladies inflammatoires cutanées telles que le psoriasis ou l'eczéma allergique de contact (Pasparakis *et al.*, 2014).

La peau est composée de trois couches tissulaires superposées : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 1).

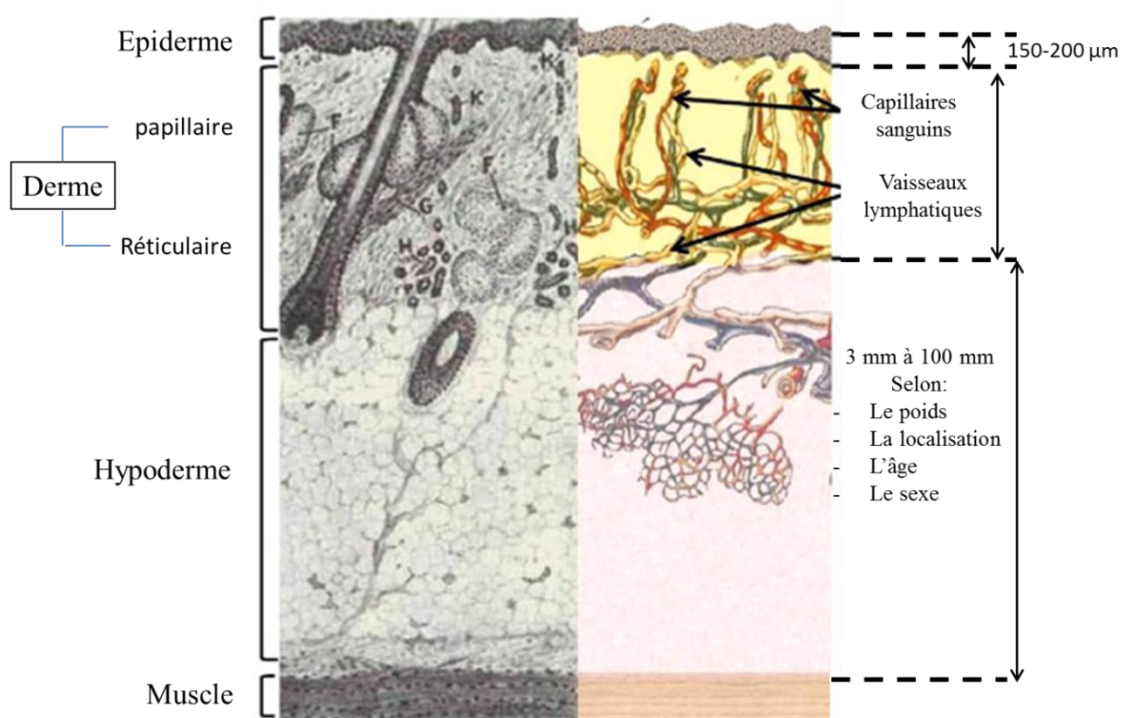


Figure 1 : Anatomie cutanée
D'après Lambert and Laurent, 2008

1.1. L'épiderme

En empêchant l'entrée d'agents chimiques et biologiques, l'épiderme représente la barrière physique du corps et en assure ainsi la protection mécanique, chimique, *via* la sueur et le sébum, et physiologique contre les agressions. L'épiderme est un tissu non vascularisé où les nutriments arrivent principalement par diffusion passive à partir du derme. Il s'agit d'un épithélium stratifié, squameux et kératinisé organisé en cinq couches superposées : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse, la couche claire et la couche cornée (Figure 2).

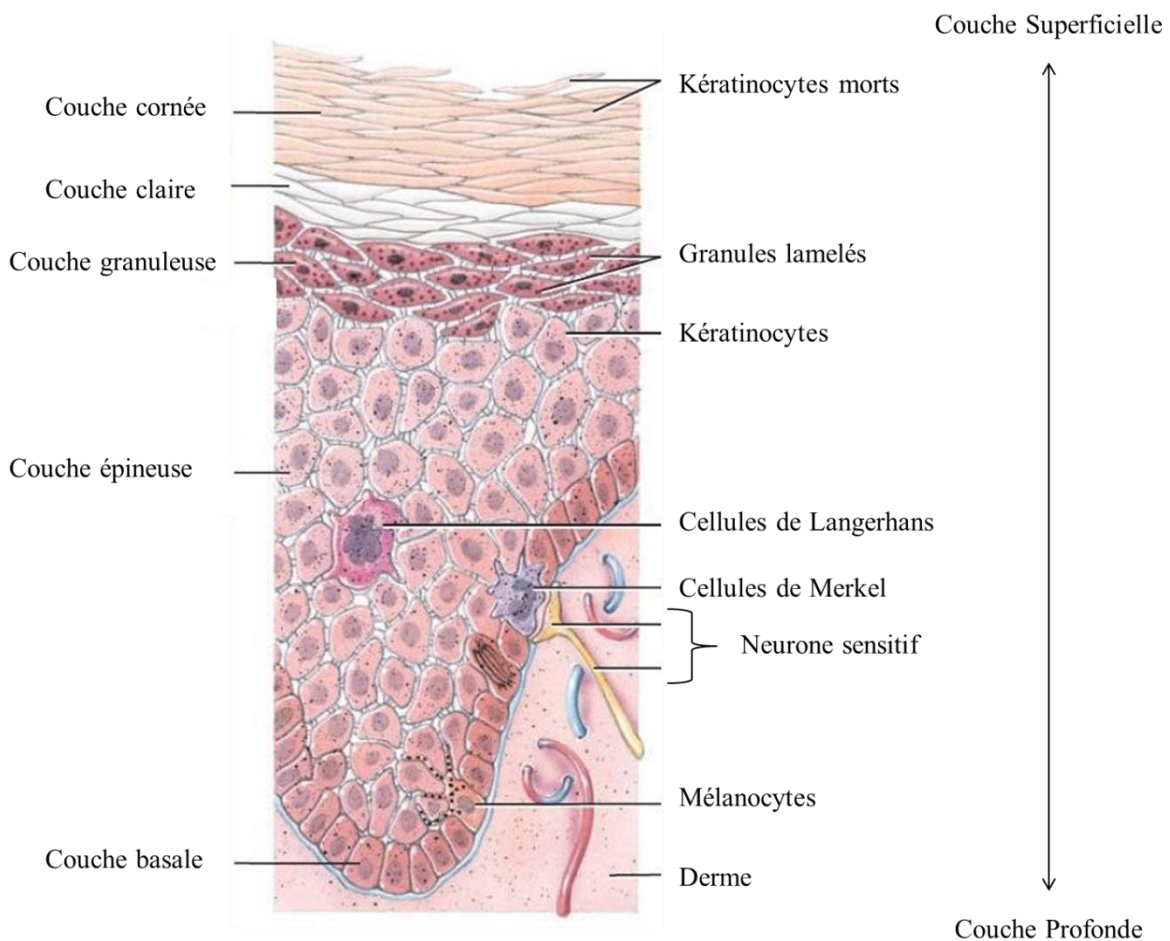


Figure 2 : Structure de l'épiderme
D'après Tortora and Derrickson, 2007

Plusieurs types cellulaires constituent l'épiderme :

- **Les kératinocytes**

Les kératinocytes (KC) représentent environ 90% des cellules épidermiques. Ils forment la première ligne de défense de l'organisme en assurant la cohésion et l'imperméabilité de l'épiderme afin de lutter contre les agressions extérieures (microorganismes, chaleur, radiations ultra-violettes (UV) et déshydratation). Au cours de leur différenciation, les KC migrent de la couche basale vers la couche cornée (Figure 2) où ils meurent par apoptose et sont éliminés par desquamation. Les KC produisent de la kératine, une protéine fibreuse, particulièrement concentrée dans la couche cornée, lui conférant une forte résistance. La cohésion et la souplesse de l'ensemble sont renforcées par une couche de lipides constitués de céramides, de cholestérol et d'acides gras (Proksch *et al.*, 2008).

Les kératinocytes jouent un rôle crucial dans l'initiation et le développement des réactions inflammatoires cutanées, ceci sera développé plus en détail dans la partie II.2.1.

- **Les mélanocytes**

Les mélanocytes représentent 8% des cellules épidermiques et sont principalement localisés dans les couches profondes de l'épiderme où ils synthétisent la mélanine. Ils assurent la pigmentation de la peau et participent à sa protection contre les rayons UV. Les mélanocytes rentrent en contact avec les KC par leurs prolongements longs et minces afin de leur transférer la mélanine. La mélanine ainsi absorbée s'accumule dans les KC et forme une barrière pigmentaire qui protège les cellules des rayons UV (McLafferty *et al.*, 2012).

- **Les cellules de Langerhans**

Les cellules de Langerhans (LC) représentent 3 à 5 % des cellules épidermiques (Merad *et al.*, 2013). Localisées dans les couches basales et supra-basales de l'épiderme, elles appartiennent au groupe des cellules dendritiques (DC) assurant ainsi une surveillance immunitaire. La forme étoilée de leur corps cellulaire se prolonge par de longues dendrites qui leur permettent de capturer les corps étrangers ayant franchi la barrière cutanée.

Leurs fonctions immunitaires seront détaillées dans la partie I.2.2.1.

- **Les cellules de Merkel**

Les cellules de Merkel sont les cellules les moins nombreuses de l'épiderme et sont situées dans la couche la plus profonde de l'épiderme, en contact avec les terminaisons nerveuses (Tortora and Derrickson, 2007). Elles sont comparées à des mécanorécepteurs car elles sont fortement impliquées dans la perception de stimulations mécaniques, en contribuant à la formation d'une synapse nerveuse (Ma, 2014). Ces cellules sont donc particulièrement abondantes dans les régions sensibles au toucher telles que les lèvres, les paumes des mains et les plantes des pieds.

- **Les lymphocytes T**

De même que les cellules de Langerhans et les kératinocytes, les lymphocytes T (LT) interviennent dans les réponses immunitaires ; leurs fonctions seront décrites dans un chapitre à part (chapitre I.2.3).

1.2. Le derme

L'épiderme est séparé du derme par une fine couche de fibres : la lame basale. Le derme est un tissu conjonctif, principalement composé de fibres de collagène et d'élastine qui lui confèrent son élasticité (Tortora and Derrickson, 2007). Les vaisseaux lymphatiques dermiques transportent les molécules et/ou les cellules vers les ganglions drainants, et lors d'une inflammation, les capillaires sanguins permettent le recrutement de cellules immunitaires. Le derme est majoritairement constitué de fibroblastes. Ils produisent les protéines de la matrice extracellulaire (MEC) (collagène et élastine), les protéines d'adhésion (laminine et fibronectine), et la substance fondamentale (les glycosaminoglycanes tels que l'acide hyaluronique et les glycoprotéines). Les fibroblastes participent ainsi à divers processus physiologiques tels que la cicatrisation des plaies mais sont aussi impliqués dans l'inflammation (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014).

Les parois des vaisseaux sanguins et lymphatiques du derme sont constituées de cellules endothéliales, impliquées dans de nombreux processus physiologiques de la peau. Les cellules endothéliales peuvent augmenter la perméabilité des vaisseaux ou guider la migration de cellules immunitaires en produisant des gradients de chimiokines (Weber *et al.*, 2013). D'autres populations cellulaires telles que les DC, les macrophages, les LT et les

mastocytes sont présentes dans le derme et peuvent également intervenir dans les réponses immunitaires cutanées et seront détaillées par la suite.

1.3. L'hypoderme

L'hypoderme est le compartiment le plus profond et le plus épais de la peau. Il s'agit du tissu sous-cutané qui lie la peau avec les structures sous-jacentes. Des fibres de collagène assurent la connexion du derme avec l'hypoderme. L'hypoderme est composé principalement de cellules adipeuses, séparées par du tissu conjonctif lâche, richement vascularisé et innervé. Le tissu adipeux de l'hypoderme joue un rôle de réserve énergétique et d'isolant thermique (Dréno, 2009).

Chaque couche de la peau a donc ses caractéristiques propres, avec ses différentes populations cellulaires qui lui permettent d'assurer une protection de l'organisme en permettant une réponse immunitaire efficace en cas d'agression.

La peau est un tissu polyvalent qui assure de multiples fonctions afin de maintenir l'homéostasie corporelle (Thèse de Biliانا Todorova, 2014) :

- **Une fonction protectrice** : la peau forme une enveloppe imperméable qui protège les tissus internes des agents chimiques et biologiques de l'environnement extérieur. Elle limite les agressions des rayons UV et empêche le dessèchement des organes profonds.
- **Une fonction régulatrice** : la peau participe au maintien de la température corporelle par vasodilatation ou vasoconstriction du réseau vasculaire cutané, ou grâce à la transpiration qui permet d'évacuer la chaleur excessive.
- **Une fonction sécrétoire** : grâce aux glandes sudoripares, la peau participe à la constance du milieu intérieur, en éliminant de l'eau, des sels minéraux et certaines toxines de l'organisme.
- **Une fonction sensorielle** : la peau est richement innervée ce qui permet de réagir à la chaleur, au froid, à la douleur ou à la pression.
- **Une fonction métabolique** : la peau possède des enzymes de détoxification [cytochrome P450 (CYP450)] et de métabolisation des xénobiotiques (enzymes de

phase II) qui lui permettent d'assurer une fonction métabolique. Elle participe à la production de vitamine D et au métabolisme des lipides.

- **Une fonction immunitaire** : étant constamment exposée à des microorganismes et des antigènes du milieu environnant, la peau est l'organe le mieux équipé pour répondre à une stimulation immunologique.

2. Immunité cutanée : acteurs et effecteurs

C'est en 1983 que Streilein décrit le réseau de cellules immunes circulantes entre la peau, les ganglions lymphatiques et le sang. Il nomme ce réseau « tissu lymphoïde associé à la peau » (SALT) (Streilein, 1983). Par la suite, l'ensemble des cellules impliquées dans l'immunosurveillance cutanée a été regroupé sous le terme de système immunitaire de la peau (SIS). Depuis, les connaissances sur les populations cellulaires qui assurent la protection de la peau n'ont cessé de croître. La caractérisation des marqueurs de surface et les études fonctionnelles ont permis de décrire des sous-classes de cellules immunitaires (Figure 3). Les DC forment une population qui présente une vaste hétérogénéité, leurs fonctions dépendant fortement du contexte immunologique. De plus, les mécanismes de la signalisation cellulaire et les récepteurs impliqués dans la détection des signaux de danger sont à ce jour mieux connus.

Dans un premier temps, l'un des objectifs de ce travail est de décrire l'organisation de ce réseau immunitaire pour le maintien de l'homéostasie cutanée et le rôle de ses acteurs dans la réponse immune.

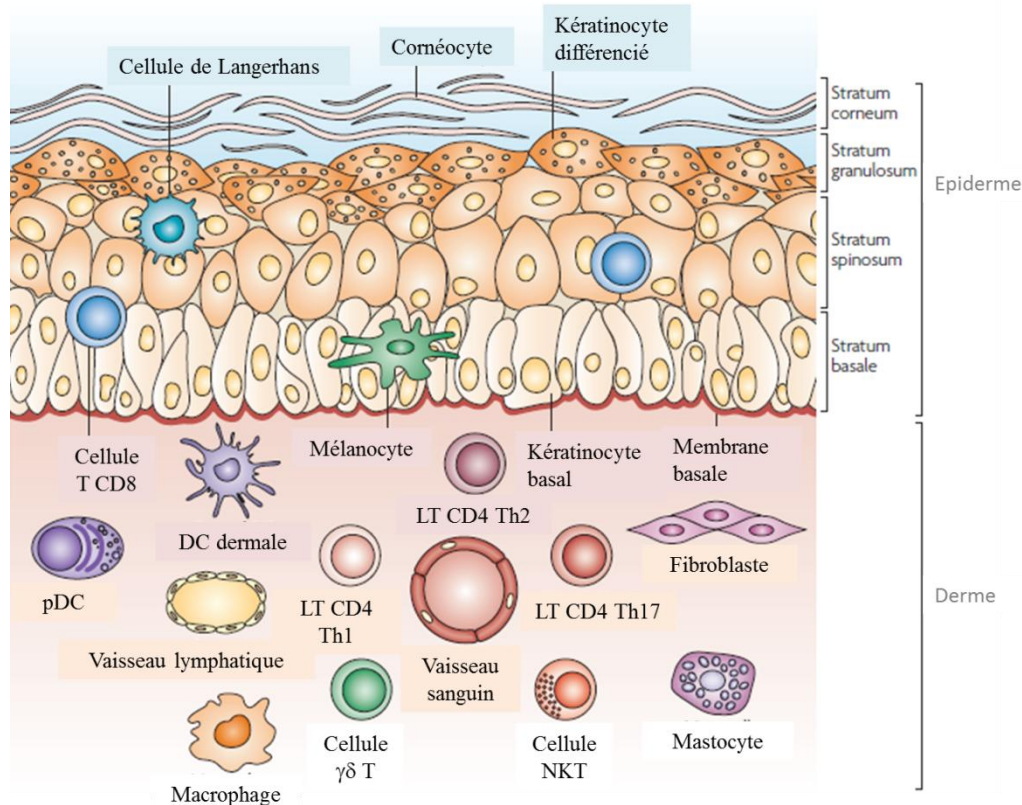


Figure 3 : Effecteurs du système immunitaire dans la peau humaine
(Nestle *et al.*, 2009)

2.1. Les kératinocytes, sentinelles immunitaires

En plus de leur fonction de maintien de la barrière physique cutanée, les KC sont des acteurs importants de l'immunité innée. Ces cellules expriment des récepteurs de la famille des Toll : les Toll-Like Receptors (TLR) membranaires (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, et TLR6) ou endosomiques (TLR3, TLR7 et TLR9). Ces TLR sont capables de reconnaître divers composés microbiens appelés Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) tels que le lipopolysaccharide (LPS), les peptidoglycanes, la flagelline et les acides nucléiques (Lebre *et al.*, 2007) (Figure 4). Une autre classe de protéines, les Nod-Like Receptor (NLR) codées par la famille de gènes *leucine-rich repeat-containing*, est également présente à la surface des kératinocytes et est capable de reconnaître les PAMPs, ainsi que les Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs) endogènes tels que les fragments de MEC. L'activation des NLR conduit à l'activation de voies de signalisation pro-inflammatoires *via* l'inflammasome, un complexe multi-protéique composé par un des NLR, une protéine adaptatrice ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain) et la pro-

caspase 1 (Martinon *et al.*, 2009). L'assemblage de l'inflammasome conduit à l'activation de la caspase 1 qui va alors cliver la pro-interleukin-1 β (pro-IL-1 β) et de la pro-IL-18 générant ainsi des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 actives sécrétées (Martinon *et al.*, 2009) (Figure 4).

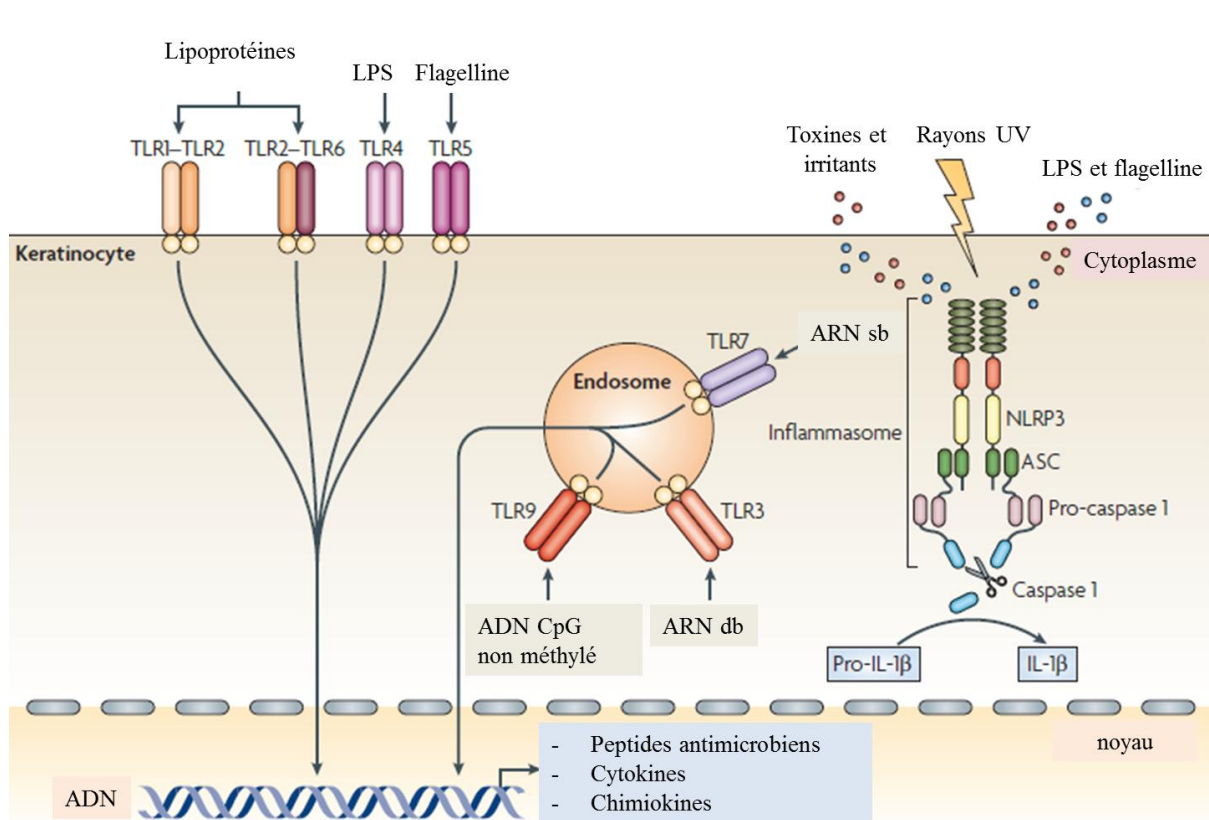


Figure 4 : Les kératinocytes, sentinelles de l'immunité
(Nestle *et al.*, 2009)

Il a été montré que les irradiations UV ainsi que les molécules allergisantes cutanées activent l'inflammasome dans les kératinocytes humains (H. Watanabe *et al.*, 2007), entraînant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires clés dans l'initiation d'une réponse inflammatoire.

Par ailleurs, les KC de la peau sont une source importante de peptides antimicrobiens (AMPs) : les β -défensines et les cathélicidines, protégeant ainsi la peau des invasions microbiennes (Lai and Gallo, 2009). En plus des AMPs, les KC sécrètent constitutivement ou après induction diverses interleukines incluant l'IL-1, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-18 et le facteur de nécrose tumorale (TNF), ainsi que de nombreuses chimiokines telles que CC-chimokine ligand 20 (CCL20), CXC-chimokine ligand 1 (CXCL1), CXCL8, CXCL10 et CXCL11. Tous ces médiateurs

modulent la réponse immunitaire en attirant différents types cellulaires (cf paragraphe II.3). Il a été montré que les KC expriment le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMH II) dans diverses pathologies cutanées, suggérant que les KC sont des Cellules Présentatrices d'Antigène (CPA) non professionnelles en conditions inflammatoires (Nestle *et al.*, 2009).

Ainsi, les kératinocytes sont des effecteurs pro-inflammatoires stratégiquement positionnés à l'interface entre l'organisme et l'environnement extérieur.

2.2. Les cellules dendritiques : à l'interface entre l'immunité innée et adaptative

Les DC sont des CPA professionnelles jouant un rôle majeur tant dans l'immunité innée, première ligne de défense, que dans l'immunité acquise ou adaptative, spécifique d'un pathogène. Les DC assurent le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

Les DC immatures ont la capacité de capturer un antigène (Ag), induisant dès lors leur maturation, tandis que les DC matures sont capables de présenter l'Ag aux LT naïfs entraînant ainsi leur activation. Les DC sont ainsi uniques dans l'initiation d'une réponse immunitaire spécifique de l'Ag (Banchereau and Steinman, 1998).

Les DC proviennent d'un progéniteur commun de cellules souches hématopoïétiques issues de la moelle osseuse. Elles résident principalement dans les tissus périphériques et les organes lymphoïdes, et forment un réseau de cellules sentinelles notamment au sein des épithéliums muqueux (bouche, œsophage, poumons, vessie), ainsi que dans la peau (Shortman and Naik, 2007).

Les DC peuvent être divisées en deux grandes catégories : les DC myéloïdes classiques ou conventionnelles (cDC) et les DC plasmacytoïdes (pDC). Les cDC sont dans la circulation sanguine ou résident dans les tissus périphériques et les organes lymphoïdes secondaires. Les pDC sont présentes dans le sang périphérique et sont aussi capables de migrer jusqu'aux organes lymphoïdes ou aux tissus durant un phénomène inflammatoire. L'épiderme comporte essentiellement des cellules de Langerhans, seule population de DC présente dans un épiderme sain non inflammé, tandis que le tissu conjonctif du derme contient différentes sous-populations de DC (Gros and Novak, 2012).

2.2.1. Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans (LC) sont une sous-population de DC localisées dans l'épiderme de la peau et qui en assurent son immunosurveillance. Ces cellules ont été décrites pour la première fois par Paul Langerhans en 1868 ; c'est une étude sur l'hypersensibilité de contact qui a mis en évidence leurs fonctions immunologiques (Silberberg *et al.*, 1976).

Les cellules de Langerhans représentent 3% à 5% des cellules épidermiques humaines et murines (Merad *et al.*, 2013). Elles forment un réseau dense entre les interstices des kératinocytes. En conditions non inflammatoires, les LCs présentent une activité mobile unique, appelée dSEARCH, qui consiste à explorer la présence d'Ag dans le milieu environnant à l'aide de la contraction et l'extension de leurs dendrites (Frugé *et al.*, 2012). Chez l'Homme comme chez la souris, ces cellules peuvent être caractérisées par l'expression à leur surface du marqueur hématopoïétique CD45 (antigène leucocytaire commun, également connu sous le nom de LY5) et les molécules du CMH de classe II (Tableau 1).

Le phénotype des LC est caractérisé par l'expression à leur surface de la langérine (CD207), un récepteur de lectine C de type II et par la présence d'organelles cytoplasmiques appelés granules de Birbeck. La formation des granules de Birbeck dépend de la présence de langérine, suggérant leur implication dans les mécanismes d'endocytose des antigènes (Valladeau and Saeland, 2000). De plus, les LC murines et humaines expriment constitutivement des molécules d'adhésion telles que l'E-cadhérine, l'epithelial-cell adhesion molecule EpCAM, et la β 1-intégrine qui leur permettent de s'ancrer aux kératinocytes (Merad *et al.*, 2008). Les LC expriment également de manière constitutive le CD205, également connu sous les noms de DEC205 et LY75, une lectine impliquée dans la capture et l'apprêtement des Ag (Merad *et al.*, 2008).

Marqueurs	LC murines	LC humaines
Langérine (CD207)	+++	+++
Granules de Birbeck	++	++
CD45	+	+
CMH II	++	++
CD11c	+	+
CD205	++	-
CD11b	+	+/-
E-Cadherin	++	++
EpCAM	++	+
CD103	-	ND
CD8	-	ND
CCR6	+	+
CCR7	-	-
CD1a	-	+++
CD1d	ND	-
CD1c	++	++

Tableau 1 : Phénotype des LCs murines et humaines

[ND : Non Déterminé]. D'après Merad *et al.*, 2008

- **Origine et homéostasie des LC**

A l'état basal, les LC sont dotées de la capacité d'auto-renouvellement continu, indépendamment des progéniteurs du sang ou de la moelle osseuse mais à partir de précurseurs localisés dans l'épiderme avant la naissance (Merad *et al.*, 2013). Environ 10% des précurseurs des LC dérivent de macrophages du sac de Yolk durant l'embryogénèse, mais la majorité de ces précurseurs sont issus des monocytes hépatiques fœtaux (Sparber, 2014). En effet, des travaux réalisés dans des modèles de transplantation de moelle osseuse chez la souris irradiée ont montré que les LC de l'hôte d'origine persistaient dans la peau pendant 18 mois, soulignant ainsi la capacité des LC à proliférer localement en conditions non inflammatoires (Merad *et al.*, 2002). En revanche, toutes les DC des autres organes ont

été totalement renouvelées 2 mois après irradiation à partir des cellules de la moelle osseuse transplantée. En cas d'inflammation, le réseau de LC est rapidement reconstitué par des progéniteurs sanguins. Une étude menée sur des souris déplétées en LC exposées durant 2 semaines aux UV a montré le recrutement de précurseurs hématopoïétiques circulants qui se différencient en LC proliférant dans la peau et reconstituant le pool de LC cutanées (Merad *et al.*, 2002).

Les LC humaines prolifèrent *in situ* et persistent indéfiniment dans la peau humaine transplantée sur des souris immunodéficientes (Kanitakis *et al.*, 2004). Similairement à leurs homologues murins, ces résultats montrent que les LC humaines se renouvellent localement. Ceci s'explique probablement par un mécanisme d'adaptation de l'épiderme, lié à l'absence de vaisseaux sanguins et de la séparation du derme par la membrane basale (Malissen *et al.*, 2014).

- **Rôle des LC dans l'immunité**

Les LC jouent un rôle crucial dans l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative (Bangert *et al.*, 2011). Après avoir détecté un antigène, les LC sont capables de le capturer, enclenchant ainsi le processus de maturation. L'expression de la E-cadhérine va alors être diminuée au profit de l'expression du CMH de classe I et II, de molécules de co-stimulation telles que le CD40, CD80 et CD86, ainsi que de récepteur aux chimiokines comme CCR7, indispensable à la migration des LC jusqu'aux ganglions drainants afin de présenter l'Ag aux LT et d'initier une réponse immunitaire spécifique de l'Ag (Kaplan *et al.*, 2012).

Bien que leur rôle immunogène soit aujourd'hui bien établi, de nouveaux paradigmes décrivant un rôle tolérogène des LC voient le jour depuis la dernière décennie. Chez des souris déficientes en LC, l'application cutanée de faibles doses de la molécule allergisante dinitrofluorobenzène (DNFB) entraîne une hypersensibilité cutanée plus forte que chez les souris possédant des LC (Bobr *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'application cutanée d'une molécule chimique faiblement allergisante dinitrothiocyanobenzène (DNTB) à des souris n'induit pas de réaction allergique. Mais la déplétion des LC inhibe la tolérance au DNTB et entraîne le développement d'une réaction allergique (Gomez de Agüero *et al.*, 2012). Cette étude a mis en évidence que les LC induisent des LT régulateurs (Treg) ou inhibent la prolifération des LT CD8⁺, protégeant ainsi les souris d'une réaction inflammatoire d'origine allergique induite par le DNTB (Gomez de Agüero *et al.*, 2012). D'autre part, les LC peuvent produire de l'IL-10,

qui joue un rôle tolérogène et contrôle la réponse allergique (Igyarto *et al.*, 2009). En l'absence d'Ag exogène, les LC induisent *in vivo* la prolifération d'une sous-population de LT résidents mémoires cutanés ayant un phénotype de LT régulateur $CD4^+CD25^+FoxP3^+CD127^-$. Ceci permet ainsi le maintien d'un état de tolérance cutanée (Seneschal *et al.*, 2012). Cependant, en présence d'un pathogène tel que *Candida albicans*, ces mêmes LC sont capables d'activer des LT effecteurs mémoire $FoxP3^{low}CD127^+$ et la sécrétion des cytokines effectrices Interféron γ (IFN γ) et IL-17 (Seneschal *et al.*, 2012).

Ainsi, selon la nature du signal de danger, les LC peuvent être tolérogènes ou immunogènes (Malissen *et al.*, 2014).

2.2.2. Les cellules dendritiques dermales

Les cellules dendritiques dermales (DDC) représentent 3% de la population totale des DC et constituent une autre sous-population de DC résidentes dans la peau. Ces cellules sont continuellement renouvelées par recrutement à partir de progéniteurs de la moelle osseuse et se caractérisent surtout par l'expression du CD11c, du CD45, du CMH II, et de la sous-unité A du facteur XIII de coagulation (FXIIIa). Contrairement aux LC, elles n'expriment pas de granules de Birbeck (Bangert *et al.*, 2011) (Tableau 2).

Les DDC sont divisées en plusieurs sous-populations : elles sont tout d'abord caractérisées par l'expression ou non du CD11b chez la souris, et CD1c chez l'Homme (Malissen *et al.*, 2014). Les cellules $CD11b^+$ ou $CD1c^+$ sont les cDC les plus abondantes dans le derme sain. Une partie des cDC $CD11b^+$ expriment le gène *aldh1a2* qui code pour la rétinol déshydrogénase 2, facteur limitant de la production de l'acide rétinoïque. L'acide rétinoïque est un métabolite de la vitamine A qui promeut la génération de Treg à partir de LT $CD4^+$ naïfs (Guilliams *et al.*, 2010).

Les DDC $CD11b^-$ sont divisées en 2 sous-populations : $CD103^+$ et $CD103^-$ (Tableau 2). Chez l'Homme, les cDC $CD1c^-$ sont $CD141^{high}$ et forment une population mineure. Les DDC [$CD103^+$, langérine $^+$] murines et DDC $CD141^{high}$ humaines excellent dans la présentation d'auto-Ag dérivés des kératinocytes (Malissen *et al.*, 2014). Les DC $CD141^{high}$ n'expriment pas le CD14 et peu le CD11c (Haniffa *et al.*, 2015).

Chez la souris, une population de DDC $CD103^+$ est également $CD207^+$ (langérine $^+$) qui n'est pas retrouvée chez l'homologue $CD141^{high}$ humain. Il a récemment été montré que des DDC

myéloïdes CD1c⁺ expriment la langérine et sont présentes dans plusieurs organes comme la peau, le foie et les poumons (Bigley *et al.*, 2014).

Marqueurs cellulaires	Souris		Homme
	DC langerine ⁺ dermales DDC CD103 ⁺	DC langerine ⁻ dermales DDC CD103 ⁻	DC langerine ⁻ dermales DDC CD141 ^{high}
Langerine (CD207)	++	-	-
Granules de Birbeck	-	-	-
CD45	+	+	+
CMH II	++	++	++
CD11c	++	++	+
CD205	-	++	-
CD11b	+/-	++	++
F4/80	-	+	ND
E-Cadhérine	ND	ND	-
EpCAM	-	-	-
CD103	++	-	ND
CCR6	ND	-	-
CCR7	+++	+++	+++
CD1a	-	-	++
CD1d	ND	ND	+
CD141 (BDCA-3)	-	-	+++

Tableau 2 : Les marqueurs phénotypiques des DC cutanées murines et humaines

D'après Ainscough *et al.*, 2012; Merad *et al.*, 2008

ND : non déterminé

2.2.3. Les cellules dendritiques inflammatoires de la peau

Les DC inflammatoires sont des DC recrutées en réponse à des *stimuli* microbiens ou inflammatoires et disparaissent une fois l'inflammation résolue (Merad *et al.*, 2013). Il existe plusieurs sous-populations de DC inflammatoires, caractérisées par leurs marqueurs phénotypiques (Tableau 3) (Bangert *et al.*, 2011; Gros and Novak, 2012):

- **Les cellules dendritiques inflammatoires épidermales (IDEC)** : sont localisées au niveau de l'épiderme. Suite à leur activation, les IDEC expriment différents marqueurs phénotypiques (Tableau 3) et produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein-1 α), et l'IL-16 favorisant le recrutement des éosinophiles.
- **Les DC productrices de TNF α et d'iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) (Tip-DC)** : sont retrouvées au niveau du derme d'une peau enflammée. Ces DC se différencient à partir des monocytes sanguins et sont particulièrement décrites dans la peau enflammée psoriasique. Les Tip-DC sont de fortes productrices de TNF α et d'iNOS pro-inflammatoires.
- **Les DC exprimant le 6-sulpho LacNac DC (sIaDC)** : sont également présentes au niveau du derme d'une peau enflammée. Ces DC sont présentes au niveau d'un derme sain, et leur nombre est doublé dans le derme en cas d'inflammation. Elles sont caractérisées par la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α et l'IL-12.
- **Les DC plasmacytoïdes (pDC)** : circulent du sang vers les zones T des organes lymphoïdes ou vers les tissus enflammés. Ces DC ne sont pas présentes dans un derme sain mais sont retrouvées dans la peau au cours des pathologies cutanées inflammatoires comme le psoriasis ou l'eczéma de contact. Les pDC expriment seulement les TLR7 et TLR9 et jouent un rôle important dans l'immunité antivirale par leur capacité à produire de l'IFN de type I tels que l'IFN α et l'IFN β . Dans le psoriasis, il a été montré que les pDC étaient activées de façon chronique par un peptide antimicrobien de cathélicidine humain, le LL-37, produit par les KC en réponse à des infections ou des lésions cutanées (Lande *et al.*, 2007). Le LL-37 se lie

aux fragments d'ADN libérés par les cellules dégradées pour former un complexe ADN/LL-37, activant les pDC *via* son TLR9 et induisant ainsi la production d'IFN de type I (Lande *et al.*, 2007).

Les IDEC, TipDC et slanDC proviennent des précurseurs myéloïdes et ressemblent phénotypiquement aux DC myéloïdes du sang périphérique (Bangert *et al.*, 2011) tandis que les pDC ont une origine lymphoïde (Reizis, 2010).

Type de DC	Marqueurs cellulaires
IDEC	CD1a, CD1b, CD11b, CD1c, CD11c, FcεRI, CD23, HLA-DR, CD206, CD36
TipDC	CD11c, CD11b, CD206, CD209
slanDC	CD11c, CD16 (FcγRIII), C5aR, CD45RA, Récepteurs de l'Histamine (H1R, H2R, H4R)
pDC	BDCA-4 (neurophilin), BDCA-2 (CD303), CD4, CD123, immunoglobulin like transcript 7, DEC-205

Tableau 3 : Les marqueurs phénotypiques des différentes DC inflammatoires cutanées
D'après Chu *et al.*, 2011; Gros and Novak, 2012

2.2.4. Les cellules dendritiques tolérogènes

En plus d'avoir mis en évidence le rôle majeur des DC dans l'initiation d'une réponse immunitaire spécifique d'un Ag, Ralph Steinman a également introduit la notion que les DC pouvaient induire et maintenir un état de tolérance central et périphérique (Steinman and Nussenzweig, 2002). Cette fonction, opposée à celle initialement découverte, est possible par le maintien des DC dans un état immature (« steady-state ») et l'induction de Treg et/ ou de LT anergiques (Probst *et al.*, 2014). En effet, selon leur état phénotypique et fonctionnel, les DC peuvent promouvoir une réponse immunogène ou tolérogène.

Comment ces DC arrivent-elles à maintenir ce fin équilibre entre immunogénicité et tolérance ? Un premier élément de réponse réside dans l'état de maturation des DC. Les DC tolérogènes (tDC), ou DC semi-matures, peuvent exprimer des molécules de co-stimulation mais ne sont pas capables de produire des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12, menant ainsi à la génération de Treg (Saei and Hadjati, 2013). Par ailleurs, les tDC sont

capables de sécréter des médiateurs anti-inflammatoires tels que l'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO), l'IL-10, le Transforming Growth Factor- β (TGF β), le monoxyde d'azote (NO), et des Prostaglandines E2 (PGE2), leur permettant d'induire et stimuler les Treg. Ces Treg vont sécréter diverses cytokines (TGF β , IL-35 and IL-10) et exprimer des molécules inhibitrices comme les protéines Cytoxic T Lymphocyte Associated protein 4 (CTLA-4), Programmed cell Death Ligand 1 (PDL-1), et Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3) permettant l'inhibition de l'activation des DC (Fig.5) (Saei and Hadjati, 2013).

Le microenvironnement cellulaire, *via* les interactions cellule-cellule, la flore microbienne, la présence de corps apoptotiques, est important dans la génération de tDC par la production de médiateurs anti-inflammatoires et tolérogènes. Parmi eux, le TGF β , le Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP), ou l'acide rétinoïque (RA) peuvent induire un environnement tolérogène (Saei and Hadjati, 2013).

Luckey et collaborateurs ont pu mettre en évidence que les tDC jouent un rôle important dans la tolérance cutanée *via* la sécrétion de TNF α par les tDC permettant la lyse des LT CD8 cytotoxiques et ainsi l'induction d'un état de tolérance à des allergènes cutanés chez la souris (Luckey *et al.*, 2011).

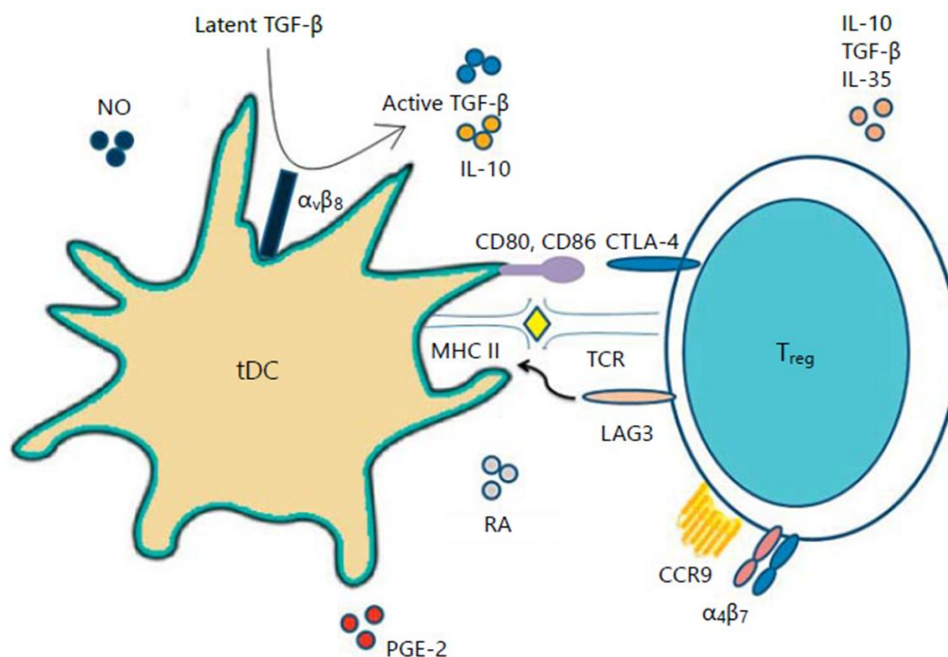


Figure 5 : Interaction entre Treg et tDC
(Saei and Hadjati, 2013)

2.3. Les lymphocytes T conventionnels et non conventionnels

En fonction de la composition des chaînes de glycoprotéines du T Cell Receptor (TCR) à la surface des LT, deux classes de LT sont distinguées. La population majoritaire est celle des $LT\alpha\beta$ conventionnels, cependant, une population minoritaire de LT présente des TCR composés de chaînes $\gamma\delta$, et forme la famille des LT non conventionnels.

2.3.1. Les lymphocytes T conventionnels

Chez l'Homme, la majorité des LT de la peau sont des $LT\alpha\beta$ conventionnels qui ont un répertoire extrêmement large de récepteurs TCR (Clark *et al.*, 2006).

En condition non inflammatoire, la peau humaine contient environ 1×10^6 LT/cm² et donc une estimation de 2×10^{10} LT cutanés au total, soit deux fois plus que leur nombre total dans la circulation sanguine (Clark *et al.*, 2006). Les LT résidant dans la peau expriment le Cutaneous Lymphocyte Antigen (CLA) qui leur permet de se lier aux cellules endothéliales vasculaires *via* l'E-sélectine. De plus, l'expression de CCR4 et CCR10 à la surface des LT cutanés leur permet d'interagir avec les chimiokines CCL17 et CCL27 produites par le derme. Les LT du derme sont regroupés autour des veinules post-capillaires en dessous de la jonction dermo-épidermique (Foster *et al.*, 1990). L'entrée des LT dans l'épiderme est dépendante de l'interaction entre la molécule VLG-1 (intégrine $\alpha 1\beta 1$) et du collagène de type IV de la membrane basale (Nestle *et al.*, 2009). La plupart des LT épidermiques se situent dans la couche basale des kératinocytes, à proximité des cellules de Langerhans et ont un phénotype effecteur $CD8^+$ (Foster *et al.*, 1990).

Cinq pourcent des LT cutanés ont un phénotype de LT naïf caractérisé par un phénotype $CD45RA^+$. Environ 95% des LT cutanés possèdent un phénotype mémoire ($CD45RO^+$) acquis lors de précédents contacts avec divers antigènes et répondent rapidement à une stimulation par ces mêmes antigènes (Clark, 2010).

2.3.1.1. Les lymphocytes T mémoires

Suite à l'activation du système immunitaire en réponse à un Ag, les DC permettent l'induction d'une prolifération clonale de LT effecteurs (T_{EFF}) dans les ganglions. Après l'élimination d'un pathogène, la majorité (90 à 95%) des T_{EFF} meurent, et seules des LT

mémoires (T_{MEM}) différenciés à partir des T_{EFF} persistent dans la circulation sanguine (Mueller *et al.*, 2013). La localisation des T_{MEM} circulants dans la peau est essentielle pour la surveillance et la maintenance de l'intégrité de la barrière cutanée. Les T_{MEM} circulants sont divisés en 2 populations distinctes : les LT mémoires centraux (T_{CM}) et les LT mémoires effecteurs (T_{EM}), distingués par leur phénotype spécifique, leur localisation (Tableau 3), leur fonction effectrice, leur capacité proliférative et leur potentiel migratoire. Contrairement aux T_{EM} , les T_{CM} expriment CCR7 et CD62L (L-sélectine) leur permettant de re-circuler du sang vers les ganglions lymphatiques. Les T_{CM} constituent une réserve de T_{EFF} en cas de réexposition au pathogène : ils sécrètent de l'IL-2 et ont un fort potentiel prolifératif tandis que les T_{EM} prolifèrent plus faiblement et sécrètent des cytokines effectrices telles que l'IFN γ (Mueller *et al.*, 2013).

Les T_{EM} expriment la molécule CLA et divers récepteurs aux chimiokines tels que CCR10, CCR4 et CCR8 (Mueller *et al.*, 2013). Les veinules capillaires de la peau expriment CCL17, E-sélectine et CCL1, ligands respectifs de CCR4, CLA et CCR8. Les cellules épidermales telles que les KC expriment le CCL27, ligand de CCR10. Ces différents couples de chimiokines-récepteurs permettent la circulation des T_{EM} entre le sang et la peau. Par exemple, les infiltrats lymphocytaires de la peau de patients souffrant de pathologies cutanées telles que l'eczéma allergique de contact présentent une forte expression de CCR10 (Homey *et al.*, 2002).

Plus récemment, une troisième population de cellules T mémoires a été mise en évidence, caractérisée par sa persistance dans les tissus après l'éradication d'un pathogène : il s'agit des cellules T mémoires résident dans les tissus T_{RM} (Mueller *et al.*, 2013).

Le tableau 4 résume les différents phénotypes et les localisations de ces 3 sous-populations.

Sous-population	Phénotype	Localisation
T_{CM}	$CD44^{high}$, $CD62L^{+}$, $CCR7^{+}$ $CD127^{+}$, $CD69^{-}$, $CD103^{-}$	Ganglions lymphatiques, rate (pulpe blanche > pulpe rouge), sang, moelle osseuse
T_{EM}	$CD44^{high}$, $CD62L^{-}$, $CCR7^{-}$, $CD127^{+}$, $CD69^{-}$, $CD103^{-}$	Rate (pulpe rouge > pulpe blanche), ganglions lymphatiques, sang, voies pulmonaires, foie, intestins, appareil reproducteur, reins, tissu adipeux et coeur
T_{RM}	$CD44^{high}$, $CD62L^{-}$, $CCR7^{-}$, $CD11a^{high}$, $CD69^{+}$, $CD103^{+}$	CD8 : épithélium cutané, estomac, vagin, glandes salivaires, poumons, cerveau, ganglions CD4 : parenchyme pulmonaire

Tableau 4 : Les populations de LT mémoires
(Mueller *et al.*, 2013)

2.3.1.2. Les lymphocytes T régulateurs

Les Treg représentent 5 à 10% des LT résidents de la peau humaine saine et sont préférentiellement localisés à proximité des LC. A l'état d'homéostasie et en l'absence d'Ag exogène, les LC induisent la prolifération de Treg $CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}CD127^{-}$, maintenant ainsi une tolérance immunitaire cutanée (Seneschal *et al.*, 2012).

Les Treg sont caractérisés par l'expression du CD25, du facteur de transcription Forkhead box P3 (FoxP3), de l'antigène lymphocytaire cutané CLA et du récepteur CCR4. L'expression de FoxP3 est requise pour le maintien des fonctions suppressives des Treg. Les Treg sont particulièrement induits dans le thymus, où l'expression de FoxP3 est initiée par la combinaison de la reconnaissance antigénique et du microenvironnement (Liston and Gray, 2014). Cependant les Treg peuvent être différenciés à la périphérie, à partir de Treg FoxP3-émigrants. Ainsi, au cours de l'inflammation, les Treg sont capables de proliférer *in situ* en présence de l'IL-15 sécrétée par les fibroblastes dermiques activés par le $TNF\alpha$. Cette cytokine peut être aussi produite par les KC durant une inflammation chronique (Clark and Kupper, 2007). Les Treg peuvent être divisés en trois sous-populations. Parmi elles, les **Treg centraux** ou Treg naïfs, sont présents dans la circulation et les organes lymphoïdes secondaires. Ces cellules sont décrites comme ayant un phénotype $CD62L^{high}CCR7^{+}$ ou $CD45RA^{high}CD25^{low}$. **Les Treg effecteurs** ou Treg activés ont été en contact avec un Ag et sont présents à court terme dans la plupart des organes non-lymphoïdes. Ils sont caractérisés par un phénotype $CD62L^{low}CCR7^{low}CD44^{high}CD103^{+}KLRG1^{+}$ (killer cell lectin-like receptor

subfamily G member 1-positive) ou CD45RA^{low}CD25^{high}. Ils ont activé des Treg résidant dans les tissus et ont par ailleurs une capacité migratoire importante. Enfin, les **Treg résidant dans les tissus** sont les Treg qui ont rencontré l'Ag et qui résident à long terme dans les tissus non-lymphoïdes, contrairement aux Treg effecteurs. Chaque tissu abrite une population de Treg résidents distincte.

Les Treg jouent un rôle important dans la régulation de la réponse inflammatoire ; leur rôle sera plus largement étudié dans la partie II.

2.3.2. Les lymphocytes T non conventionnels

Les LT non conventionnels sont composés des cellules T $\gamma\delta$ et des cellules Natural Killer T (NKT). Chez l'Homme, les LT $\gamma\delta$ sont minoritaires car ils représentent 1 à 10% des cellules T dermiques et épidermiques. Chez la souris, ces cellules épidermiques sont appelées Dendritic Epidermal T cells (DETC) et représentent 90% des LT à l'état physiologique. Il a été montré que ces DETC régulent négativement la réponse inflammatoire d'origine allergique (Girardi *et al.*, 2002). En comparaison avec les LT $\alpha\beta$, leur répertoire reste peu diversifié. A l'état basal, les LT $\gamma\delta$ interviennent dans le maintien de l'homéostasie épidermique car ils produisent constitutivement le facteur de croissance Insuline-like Growth Factor (IGF-1). Au cours d'une inflammation, ces cellules sont activées et produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-17, l'IL-22, l'IFN γ et le TNF α (Cai *et al.*, 2011). Chez les sujets atteints de psoriasis, ces LT $\gamma\delta$ produisent de grandes quantités d'IL-17, leur conférant un rôle de défense contre les pathogènes (Cai *et al.*, 2011).

Les cellules NKT forment une population hétérogène qui possède à la fois des propriétés de LT et de cellules NK. Les NKT peuvent exprimer le récepteur TCR $\alpha\beta$ et participent à la reconnaissance d'antigènes glycolipidiques présentés à la surface des molécules CD1d. Les NKT invariants (iNKT), présents dans la peau non inflammée, peuvent reconnaître des Ag du soi et du non-soi et sont capables de libérer des cytokines comme l'IFN γ (Nestle *et al.*, 2009). Les NKT ont été détectés dans les plaques de psoriasis ainsi que dans les inflammations allergiques, ce qui suggère leur implication dans la dérégulation de la réponse immunitaire (Gober *et al.*, 2008).

2.4. Les macrophages cutanés

Les macrophages (Ma) cutanés sont des cellules phagocytaires dermales majoritairement sessiles en condition basale, mais capables de migrer jusqu'aux ganglions drainants en cas d'inflammation (Nestle *et al.*, 2009). Des études chez la souris ont permis de mettre en évidence qu'il existe un pool prénatal de Ma, et un pool postnatal qui se développe à partir de monocytes sanguins $\text{Ly6C}^{\text{high}} \text{CCR2}^{\text{high}}$ (Malissen *et al.*, 2014). Les Ma éliminent environ 2×10^{11} érythrocytes par jour (Mosser and Edwards, 2008). Ils sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie tissulaire en éliminant les cellules sénescents et les débris extracellulaires. Ils jouent également un rôle important dans la réparation tissulaire (Tay *et al.*, 2014). Les Ma possèdent un cytoplasme riche en vacuoles et granules de mélanine, un noyau en forme de haricot avec le réseau de chromatine décondensée. Dans les tissus, les Ma présentent une forme allongée, contrairement aux formes sphériques des DDC (Wang *et al.*, 2014). Chez l'Homme, les Ma diffèrent des DC par l'expression des Ag CD163 et la transglutaminase FXIIIA (Nestle *et al.*, 2009).

Selon la nature du *stimulus*, les Ma sont capables de produire un large panel de cytokines pro- ou anti-inflammatoires et de chimiokines, qui attirent d'autres cellules de l'immunité sur le site lésé (Mosser and Edwards, 2008).

A ce jour, trois types de Ma sont décrits (Mosser and Edwards, 2008) :

- **Les Ma classiques activés (M1)** désignent les Ma effecteurs, produits lors de réponses immunitaires. Ils répondent à la combinaison de 2 signaux : l' $\text{IFN}\gamma$, sécrété notamment par les cellules NK, et le $\text{TNF}\alpha$, sécrété par les CPA. Il en résulte la sécrétion d'IL-1, d'IL-6 et d'IL-23 aux activités microbicides ou tumoricides.
- **Les Ma de réparation tissulaire (M2)**, produits en réponse à l'IL-4, principalement sécrétée par les basophiles dans les tissus lésés. Ces Ma sont impliqués dans la réparation tissulaire *via* la production de matrice extracellulaire.
- **Les Ma régulateurs**, impliqués dans les réponses immunitaires innées et adaptatives, sont caractérisés par la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. Ces Ma régulateurs peuvent induire l'expansion de lymphocytes Th2.

2.5. Les mastocytes

Les mastocytes sont particulièrement présents dans la peau et les muqueuses. Ils expriment le récepteur de forte affinité pour les immunoglobulines E (IgE) : le FcεRI, ainsi que le récepteur du facteur des cellules souches SCF. Dans la peau, ils sont principalement localisés à proximité des vaisseaux sanguins du derme (Tay *et al.*, 2014). En réponse à une activation IgE-dépendante par un allergène, l'interaction du récepteur FcεRI des mastocytes avec les IgE favorise la dégranulation et la libération de médiateurs vasoactifs et pro-inflammatoires, participant à la mise en place de la réponse de type Th2 dans les réactions allergiques (Theoharides and Kalogeromitros, 2006). En effet, les mastocytes libèrent de façon rapide et immédiate de nombreux médiateurs pro-inflammatoires incluant l'histamine, des chimiokines telles que l'IL-8, la Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1), la MCP-3 et RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted), des enzymes protéolytiques et des peptides comme la substance P et la bradikinine, des facteurs de croissance [GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), CSF (colony stimulating factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)], ainsi que les métabolites de l'acide arachidonique (Theoharides *et al.*, 2012). Ces médiateurs participent à la mise en place et au maintien d'une réaction d'hypersensibilité (HS) de type I (HS immédiate).

Bien que les mastocytes soient impliqués dans de nombreuses pathologies inflammatoires telles que l'asthme, la dermatite atopique et le psoriasis (Theoharides and Kalogeromitros, 2006; Theoharides *et al.*, 2012), ils possèdent une certaine plasticité qui leur permet une réponse pro- ou anti-inflammatoire, suggérant leur rôle protecteur contre les pathogènes et la cicatrisation des plaies (Galli *et al.*, 2005). Leur rôle reste cependant controversé : tandis que certaines études montrent que les souris déficientes en mastocytes (souris *W/W^v* et *Sl/Sl^d*) développent une réaction inflammatoire d'origine allergique réduite en réponse au trinitrochlorobenzène (TNCB) (Biedermann *et al.*, 2000), d'autres études mettent en avant leur rôle régulateur. Des souris déficientes en mastocytes, mutées sur le gène *kit* (appelé également « Mast/stem cell growth factor receptor » (récepteur du facteur de croissance des mastocytes et des cellules souches) développent une réaction inflammatoire d'origine allergique exacerbée en réponse au DNFB et à l'urushiol (Grimbaldeston *et al.*, 2007). Dans ce modèle, le rôle régulateur des mastocytes dépend de leur production d'IL-10.

2.6. Les fibroblastes

Les fibroblastes sont les acteurs principaux de la construction des tissus de connexion. Outre leur fonction de cellules productrices de MEC, les fibroblastes ont plusieurs rôles biologiques : ils interviennent dans le processus de fibrose, et ainsi dans la cicatrisation tissulaire, l'inflammation et l'angiogenèse *via* la production de VEGF. Par ailleurs, les fibroblastes régulent le renouvellement du collagène par la sécrétion d'enzymes de digestion de la matrice comme les metalloproteinases (MMP) et leurs inhibiteurs (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014).

Par ailleurs, les fibroblastes de la peau humaine exprimant tous les récepteurs TLR actuellement identifiés (TLR 1 à 10), ils sont donc capables de détecter un signal de danger. En conditions inflammatoires, ils s'activent en réponse à diverses cytokines telles que le TGF β , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-13 et l'IL-33, et peuvent eux-mêmes produire du TGF β , de l'IL-1 β , de l'IL-33, CXCL-12, PGE2 et des espèces réactives de l'oxygène (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014). Par leur capacité à produire des facteurs de croissance des kératinocytes (KGF-1 et KGF-2, EGF), les fibroblastes peuvent stimuler la prolifération de ces derniers (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014). Enfin, les fibroblastes peuvent contribuer à la persistance de l'inflammation chronique.

3. Détection des signaux de danger et déclenchement de la réponse immunitaire cutanée

La peau est un organe complexe et dynamique, qui a pour but d'assurer une défense physique et immunologique de l'organisme. Devant faire face à une myriade de stress environnementaux, la peau doit par conséquent constamment s'adapter pour maintenir l'homéostasie tissulaire. Dans le chapitre précédent nous avons décrit l'organisation de la peau en termes de structures et cellules capables de réagir en cas de menace. Nous allons maintenant étudier comment ces cellules détectent le danger et transmettent l'information afin de mettre en place une réponse immunitaire appropriée.

3.1. Qu'est-ce qu'un signal de danger?

Dans les années 50, la théorie du soi et du non soi dominait en immunologie (Burnet and Fenner, 1949; Tauber, 1994). C'est en 1994 que Polly Matzinger, immunologiste américaine, a introduit un nouveau concept avec la notion de signaux de danger : le but premier du système immunitaire n'est pas de discriminer le soi du non-soi, mais de détecter un danger et d'en protéger l'organisme. Selon la nature du pathogène, ce signal déterminera si le système immunitaire conduira à un état de tolérance ou à l'enclenchement d'une réaction immune face au danger.

Ces signaux de danger, appelés « SOS du système immunitaire », sont des molécules ou des structures moléculaires libérées ou produites par des cellules sous l'effet d'un stress ou d'une mortalité cellulaire anormale, et reconnues par le système immunitaire (Gallucci and Matzinger, 2001).

S'il s'agit d'une agression microbienne, les corps étrangers (virus ou bactéries) libèrent des « Pathogen-Associated Molecular Patterns » (PAMPs), reconnus par les « Pattern Recognition Receptos » (PRR) du système immunitaire, déclenchant ainsi une réponse inflammatoire. Les PAMPs incluent les acides nucléiques de virus ou bactéries, des composants de la paroi fongique (β -glucane et α -mannane), la protéine bactérienne flagelline, des peptidoglycanes de la paroi bactérienne et des LPS des bactéries Gram négatif (Newton and Dixit, 2012). L'inflammation stérile, quant à elle, est induite par la libération de molécules endogènes appelées « Danger-Associated Molecular Pattern » (DAMPs) (Schaefer, 2014). Les DAMPs sont des molécules endogènes cachées des PRRs par leur compartimentation (DAMPs intracellulaires) ou par leur séquestration dans la MEC (DAMPs extracellulaires) (Schaefer, 2014). Les DAMPs sont naturellement libérés par les cellules endommagées et regroupent l'acide urique, la protéine HMGB1, les β -défensines, les protéines de choc thermique, les acides nucléiques du soi, l'ATP, IL-1 α , les protéines de liaison au calcium (S1008A et S100A9) (Schaefer, 2014).

Plusieurs classes de DAMPs sont identifiées sur la base de leur origine ou de leur nature chimique (Tableaux 5 et 6).

3.1.1. Les DAMPs extracellulaires ou DAMPs dérivés de la MEC

Diverses molécules séquestrées par la MEC en condition normale peuvent être libérées de celle-ci par des enzymes protéolytiques telles que les MMPs à la suite d'une blessure tissulaire afin d'agir comme DAMPs. Certains de ces fragments solubles activent de multiples PRRs, initiant ainsi rapidement une réaction inflammatoire. Les différents DAMPs décrits à ce jour sont regroupés dans le tableau 5 (Schaefer, 2014).

	DAMP	Mécanisme de libération	Nature chimique	Récepteur
Compartiment cellulaire	Biglycane	Clivage par MMP, Synthèse <i>de novo</i>	Protéoglycane	TLR2, TLR4, NLRP3
	Décorine	Clivage par MMP, Synthèse <i>de novo</i>	Protéoglycane	TLR2, TLR4
	Versican	Sécrétion	Protéoglycane	TLR2, TLR6, CD14
	Acide Hyaluronique faible PM	Clivage par hyaluronidase	Glycosaminoglycane	TLR2, TLR4, NLRP3
	Héparane Sulfate	Clivage par héparanase	Glycosaminoglycane	TLR4
	Fibronectine-EDA+	Clivage par MMP	Glycoprotéine	TLR4
	Fibrinogène	Extravasation	Glycoprotéine	TLR4
	Tenascine C	Synthèse <i>de novo</i>	Glycoprotéine	TLR4

Tableau 5 : Nature et sources des DAMPs extracellulaires

(Schaefer, 2014)

MMP: Matrix-MetalloProteinase; NLRP3: NOD-like receptor family, pyrin domain containing-3; PM: Poids Moléculaire

3.1.2. Les DAMPs intracellulaires

Outre les DAMPs dérivés de la MEC, il existe un groupe vaste et hétérogène de DAMPs intracellulaires. Les cellules apoptotiques ou nécrotiques libèrent des molécules endogènes des différents compartiments ou organelles cellulaires, agissant dès lors comme des DAMPs extracellulaires (Schaefer, 2014).

Ces DAMPs intracellulaires peuvent provenir de divers compartiments cellulaires : de la mitochondrie (organelle qui libère le plus grand nombre de DAMPs en cas de mort cellulaire), du cytosol, de la membrane plasmique, du noyau, du reticulum endoplasmique (RE) ou d'autophagosomes. Ces différents DAMPs, leur nature et leur libération, sont regroupés dans le tableau 6 (Schaefer, 2014). Une fois les DAMPs libérés, ils doivent être reconnus par les récepteurs des cellules de l'immunité innée afin d'initier la réponse immunitaire.

	DAMP	Mécanisme de libération	Nature chimique	Récepteur
Cytosol	Acide urique	Cellules BALB/c 3T3 irradiées par UV	Dérivé nucléotides purines	NLRP3
	Protéines S100	GM-CSF, IL-1 β , Monocytes humains stimulés au LPS	Protéines liées au calcium	TLR2, TLR4, RAGE
	Heat shock proteins	Cellules nécrotiques ou apoptotiques	Protéines chaperones	TLR2, TLR4
Membrane plasmique	Syndécans	Clivage par MMP ou héparanase	Protéoglycanes	TLR4
	Glypicans	Clivage par héparanase ou déamination	Protéoglycanes	TLR4
Mitochondrie	ADN mitochondrial	Traumatisme, blessure	Acides nucléiques	TLR9
	Formyl peptide	Traumatisme, blessure	Protéines mitochondriales clivées	FPR1
	ATP	Blessure	Nucléoside Triphosphate	P2X7
	Espèces réactives de l'O ₂ mitochondriales	Perte d'électrons (fonctionnement mitochondrial)	Petit(e)s ions ou molécules réactives	NLRP3
Noyau	HMGB1	Cellules apoptotiques ou nécrotiques	Protéines de 215 acides aminés	TLR2, TLR4, TLR9, RAGE
	Histones	Durant la formation des NETs, cellules épithéliales mortes durant le sepsis	Protéines (autour desquelles l'ADN s'enroule)	TLR2, TLR4, TLR9,
	DNA	Cellules nécrotiques ou apoptotiques	Acides nucléiques	TLR9, AIM2
Réticulum Endoplasmique	Calréticuline	Anthracyclines, Oxaliplatine, Apoptose induite par les UVC ou radiations γ	Protéines du réticulum endoplasmique	CD91
Autophagosome	HMGB1	Autophagie	Protéines	TLR2, TLR4, TLR9, RAGE
	ATP	Starvation	Nucléoside Triphosphate	P2X7
	IL-1 β	Starvation	Cytokine	IL-1R

Tableau 6 : Nature et sources des DAMPs intracellulaires

(Schaefer, 2014)

NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 ; TLR : Toll like Receptor ; RAGE : receptor for advanced glycation endproducts ; MMP : Matrix-MetalloProteinase ; FPR1 : Formyl peptide Receptor 1 ; NETs : Neutrophil Extracellular Traps ; UVC : UltraViolet C ; AIM2 : absent in melanoma 2 ; P2X7 : purinergic receptor P2X, ligand gated ion channel, 7

3.2. La reconnaissance des signaux de danger

Les PRR, récepteurs situés au niveau de la membrane plasmique ou au niveau des endosomes des cellules immunitaires, forment une vaste gamme de récepteurs de défense prêts à reconnaître toute molécule exogène ou signal de danger endogène. Les principaux acteurs de l'immunité innée sont des cellules phagocytaires, tels que les macrophages, les neutrophiles et les DC. Ces cellules sont en effet dotées de TLR, leur permettant de reconnaître une grande variété de DAMPs et PAMPs.

A ce jour, cinq classes de PRR sont décrits :

- Les récepteurs Toll-like (TLR) à la surface des cellules et endosomiques
- Les récepteurs Nod-like (NLR) cytoplasmiques et de l'inflammasome
- Les récepteurs intracellulaires Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) (RLR) intracellulaires
- Les récepteurs aux lectines de type C (CLR) transmembranaires (e.g. dectin-1)
- Les récepteurs AIM2-like (Absent In Melanoma 2)

3.2.1. Les récepteurs Toll-like

- **Localisation des TLR**

A ce jour, dix TLR ont été identifiés chez l'Homme (TLR1 à 10) et douze chez la souris (TLR1 à TLR9 puis TLR11 à TLR13) (Ainscough *et al.*, 2012). Bien que la plupart des TLR soient situés à la surface cellulaire, certains comme les TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 et TLR13 peuvent être localisés sur la membrane endosomale (Schaefer, 2014). Les TLR11, TLR12 et TLR13, localisés dans les endosomes, sont exprimés chez la souris mais pas chez l'Homme. La quasi-totalité des DAMPs peuvent se lier aux TLR (Tableaux 5 et 6). Les TLR1, TLR2, TLR4 et TLR6 reconnaissent des structures lipidiques tandis que les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 reconnaissent des acides nucléiques (Tableau 7) (Moser and Leo, 2010).

Les différents types de DC n'expriment pas les mêmes TLR. Chez l'Homme, les pDCs expriment principalement les TLR7 et 9 (au niveau des endosomes), tandis que les cDC expriment la plupart des TLR : TLR1 à 6, TLR8 et TLR10. Chez la souris, les pDC expriment également le TLR7 et TLR9, et les cDC expriment tous les TLR (Nace *et al.*, 2012). Les TLR assurent une réponse immunitaire efficace et immédiate, et délivrent des signaux moléculaires distincts.

Famille des TLR	Agonistes microbiens	Ligands endogènes
TLR1	Lipoprotéines (bactéries et mycobactéries) Peptidoglycanes (bactéries Gram positif)	-
TLR2	Lipoprotéines, glycolipides, zymozan	-
TLR3	ARN double brin, siARN	ARN viral simple brin
TLR4	LPS (bactéries Gram négatif) Virus de tumeur mammaire murine, enveloppe protéique virale phosphorylcholine	Heat shock protein (HSP)2 défensine 2, fibrinogène, acide hyaluronique, HMGB-1
TLR5	Flagelline (bactéries flagellées)	-
TLR6	Lipopeptides	-
TLR7/8	ARN simple brin, imidazoquinoline, resiquimod, imiquimod	ARN viral simple brin
TLR9	CpG (bactéries)	Chromatine
TLR10	Inconnu	Inconnu

Tableau 7 : Les différents ligands des TLR humains

(Moser and Leo, 2010)

HMGB1 : High-Mobility Group Box 1

- **Structure des TLR**

Les membres de la famille des TLR humains possèdent tous une structure similaire avec un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire (riche en cystéines) et un domaine cytoplasmique. La taille importante du domaine extracellulaire riche en répétition de motifs leucine laisse supposer la présence de plusieurs sites de fixation au ligand. Ces sites sont divergents d'un TLR à l'autre, indiquant une reconnaissance de structures très variées. Le domaine cytoplasmique, également appelé Toll/IL-1 Receptor homology domain (TIR), est homologue au domaine cytoplasmique de famille des récepteurs à l'IL-1 et permet d'induire la signalisation cellulaire en recrutant des protéines adaptatrices (Anderson, 2000).

- **Signalisation**

La signalisation des TLR est initiée par des adaptateurs cytosoliques comme MyD88 (myeloid differentiation factor 88), TIRAP (TIR domain containing adapter protein)/Ma1, Trif (TIR domain containing adapter inducing IFN β)/TICAM-1 et TRAM (Trif-related adapter molecule)/TICAM-2. L'activation des TLR à la surface des DC entraîne l'activation de la voie Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) et de la voie des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) ainsi que l'activation des facteurs Activated Protein-1 (AP-1) et Interferon Regulatory Factor-3 (IRF-3) (Kawai and Akira, 2007). Deux voies de signalisation distinctes peuvent aboutir à leur activation : une voie dépendante de MyD88 et une voie indépendante de MyD88 *via* TIRAP, Trif et TRAM. L'activation de MyD88 conduit au recrutement des kinases de la famille Interleukin-1 Receptor Associated Kinases (IRAKs) et des facteurs Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factors (TRAFs) (principalement IRAK4 et TRAF6), qui forment le complexe de signalisation initial.

- **Les principaux TLR de la peau**

L'ensemble des cellules cutanées expriment des TLR. Dans les DC, l'activation des voies de signalisation décrites ci-dessus suite à l'engagement des TLR va entraîner une diminution de l'endocytose antigénique en faveur de la transformation et la présentation de l'Ag. De plus, ces voies vont permettre un réarrangement du cytosquelette et la migration des DC jusqu'aux ganglions drainants, la libération de cytokines pro-inflammatoires et l'expression de molécules de co-stimulation. L'ensemble de ces processus mène à la maturation des DC afin de leur permettre de remplir leur rôle d'initiatrices de la réponse immunitaire adaptative (Figure 6a) (Nace *et al.*, 2012).

Cependant la réponse des DC aux ligands des TLR est complexe et dépend notamment du temps d'exposition. Ainsi, il a été montré que la présence continue d'agonistes des TLR7 et 8 tels que l'agoniste synthétique imidazoquinoline R848 durant la différenciation de monocytes en DC altère des fonctions clés de la DC. La présence d'agonistes des TLR7/8 durant le processus de différenciation conduit à l'inhibition de l'expression de molécules de surface telles que CXCR1 et CD1a, qui présente les molécules non-peptidiques d'origine lipidique ou glycolipidique (Assier *et al.*, 2007). Cela entraîne également l'inhibition de l'expression de CCR7 en réponse au LPS, agoniste du TLR4, à une diminution de la capacité d'internalisation et à une inhibition de la production de cytokines clés dans

l'initiation d'une réponse lymphocytaire T. Cette étude a donc mis en avant que la présence continue d'agonistes des TLR7/8 inhibe la différenciation des monocytes en DC fonctionnelles et abroge la réponse des DC en réponse à l'activation de TLR par des pathogènes, conduisant ainsi au développement de propriétés tolérogènes (Figure 6b) (Assier *et al.*, 2007; Nace *et al.*, 2012).

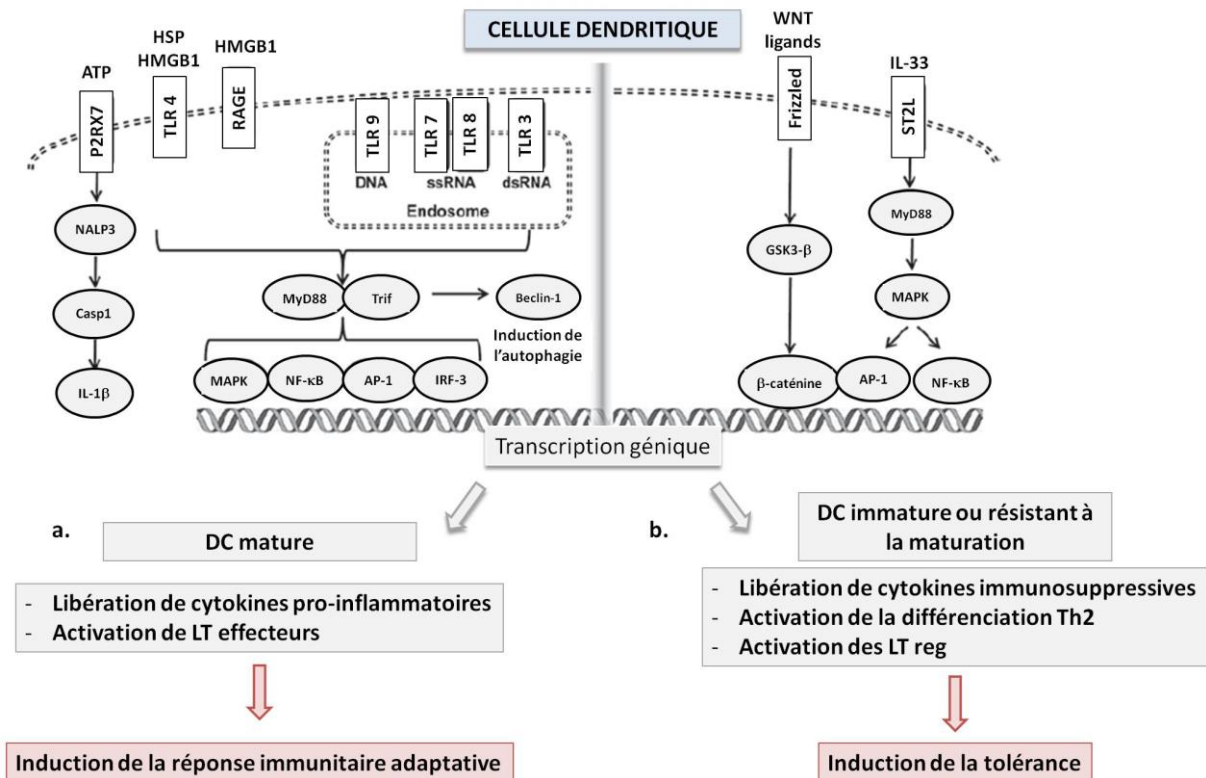


Figure 6 : Le rôle des DAMPs dans l'induction d'une réponse immunitaire adaptative

D'après Nace *et al.*, 2012

a. Les DAMPs peuvent induire la maturation des DC, avec l'expression du CMH I et CMH II, des molécules de co-stimulation et de cytokines pro-inflammatoires, ainsi que la capacité de migrer jusqu'aux ganglions drainants pour activer le développement de lymphocytes T effecteurs.

b. Les DC peuvent également être stimulées pour entrer dans un état résistant à la maturation ou de tolérance, inhibant ainsi le développement d'une réponse adaptative.

ST2L : Récepteur à l'IL-33 ; RAGE : receptor for advanced glycation endproducts, Trif : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β ; IRF : Interferon regulatory factor

3.2.2. Les récepteurs NOD-like

Les récepteurs Nucleotide binding Oligomerization Domain (NOD)-like sont des récepteurs cytoplasmiques qui reconnaissent divers PAMPs et DAMPs. Ils jouent un rôle important dans la défense contre les pathogènes et dans la pathogénèse de nombreuses maladies

inflammatoires. Les NLR sont exprimés sur les cellules de l'immunité telles que les lymphocytes, les macrophages et les DC ainsi que sur des cellules non immunitaires telles que les cellules épithéliales et mésenchymateuses (G. Chen *et al.*, 2009).

Cette famille de protéines se définit par une structure tripartite :

- un domaine variable N-terminal d'interaction protéine-protéine, caractérisé par un domaine CARD (caspase recruitment domain), PYD (pyrin domain), acid transactivating ou BIR (baculovirus inhibitor repeat). Ce domaine est crucial pour la signalisation en aval.
- un domaine central NOD nucleotide-binding oligomerization, qui permet l'auto-oligomérisation lors de l'activation
- un domaine C-terminal leucine-rich repeat LRR qui détecte les PAMPs.

Les NLR comptent vingt-deux membres divisés en 4 sous-familles selon la composition de leur domaine N-terminal :

- **NLRA**, avec un domaine de transactivation acide : CIITA. Il est impliqué dans la transcription du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II)
- **NLRB**, avec un domaine N-terminal BIR, composé d'un seul membre : NAIP
- **NLRC**, avec un domaine N-terminal CARD, est composé de 6 membres : NOD1, NOD2, NLRC3 (ou NOD3), NLRC4 (ou NOD4), NLRC5 (ou NOD5), NLRX
- **NLRP**, avec un domaine N-terminal PYR, est composé de 14 membres : NLRP1 à 14

Les NLR partagent certaines propriétés des TLR (Figure 7). Ainsi, NOD1 et NOD2 sont aujourd'hui bien connus par leur capacité à activer la voie NF- κ B ainsi que la voie des MAPK, induisant la transcription et la production de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines, de molécules d'adhésion et de molécules telles que la Cyclo-oxygénase 2 (Cox2) ou iNOS (G. Chen *et al.*, 2009). Les protéines NLRP, quant à elles, sont plutôt décrites pour leur capacité à réguler la sécrétion de l'IL-1 β et de l'IL-18 suite à l'activation de l'inflammasome. L'activation de l'inflammasome requiert le recrutement de la protéine ASC (adaptor protein apoptosis speck protein with caspase recruitment) pour activer la caspase 1 qui pourra alors cliver les pro-formes inactives d'IL-1 β et d'IL-18 en formes actives (Figure 7).

Le NLR le plus étudié est NLRP3. Cette protéine a été décrite comme étant cruciale pour le développement d'une sensibilisation cutanée. Des souris déficientes pour *nlrp3* développent une inflammation d'origine allergique altérée en réponse aux allergisants cutanés tels que le DNFB ou le TNCB (H. Watanabe *et al.*, 2007). Les souris invalidées pour le gène *nlrp12* (*nlrp12*^{-/-}) développent une réaction allergique plus faible que les souris sauvages en réponse à l'oxazolone (Arthur *et al.*, 2010). Chez les souris *nlrp12*^{-/-}, la migration des DC et des neutrophiles est altérée par rapport aux DC de souris contrôles. La migration *in vitro* de DC issues de souris *nlrp12*^{-/-} est inhibée en réponse à CCL19 et à CCL21, ligands de CCR7, et en réponse à CXCL12, ligand de CXCR4. La migration *in vitro* de neutrophiles issus de souris *nlrp12*^{-/-} est diminuée de 50% en réponse à la chimiokine CXCL1 en comparaison aux souris sauvages (Arthur *et al.*, 2010).

Certains NLR permettent aux DC d'interagir avec les LT. Ainsi, la protéine CIITA est un NLR agissant comme un facteur de transcription qui contrôle l'expression du CMH II à la surface des DC, nécessaire à l'activation des LT (Krishnaswamy *et al.*, 2013). D'autres études ont montré que le NLR NLRC5 permet la transcription du CMH I et de la protéine β 2-microglobuline, nécessaires à la présentation des Ag aux LT CD8⁺ (Krishnaswamy *et al.*, 2013).

D'autre part les DC expriment plusieurs types de récepteurs P2, famille de purinocepteurs à l'ATP, et tout particulièrement P2X7, un canal ionique situé dans la membrane plasmique. P2X7 est directement activé par l'ATP et est capable de générer des pores perméables aux molécules hydrophiles de manière réversible dans la membrane plasmique (Baroni *et al.*, 2007). P2X7 semble indispensable au bon fonctionnement de NLRP3 et à la génération de l'IL-1 β *via* l'activation de l'inflammasome. Des souris invalidées pour le récepteur P2X7 (*p2x7*^{-/-}) ne développent pas de réaction d'hypersensibilité cutanée en réponse au TNCB. Cette hypersensibilité est restaurée lorsque l'IL-1 β est injectée en intra-dermal aux souris *p2x7*^{-/-}, suggérant ainsi le rôle crucial de l'IL-1 β générée *via* la signalisation de P2X7 dans l'initiation d'une réponse allergique cutanée (Weber *et al.*, 2010).

Figure 7 : Voies de signalisation des TLR et NLR

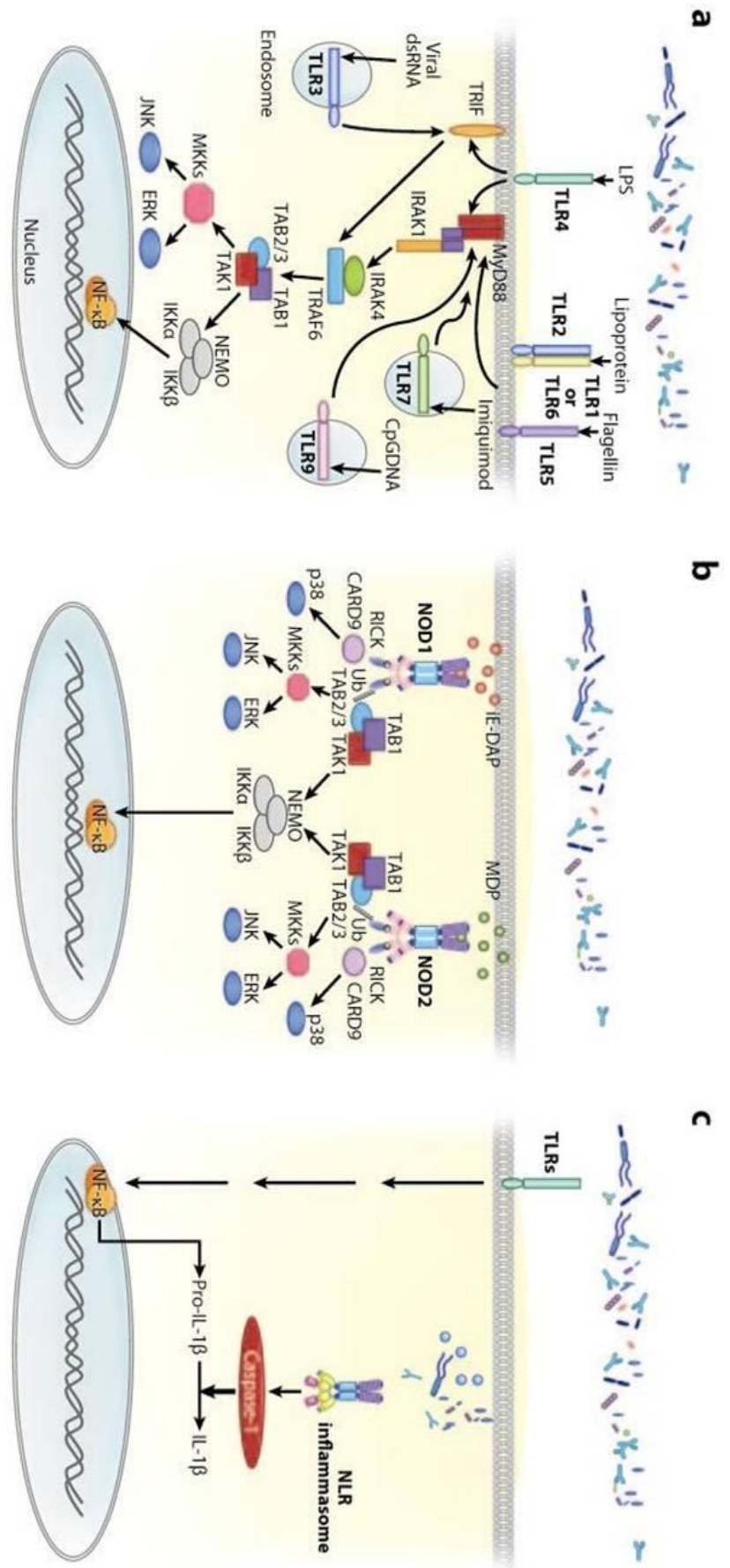
D'après G. Chen *et al.*, 2009

a. Les PAMPS sont reconnus par les TLR membranaires et endosomiques qui activent la signalisation *via* les adaptateurs MyD88 et Toll/interleukin-1 receptor-domain-containing adapter-inducing interferon beta (TRIF) ou via les protéines interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) et tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6).

b. Les NLR NOD1 et NOD2 détectent respectivement le D-g-glutamyl-meso-DAP (iE-DAP) intracellulaire et le muramyl dipeptide (MDP) entraînant le recrutement des protéines adaptatrices RICK et caspase recruitment domain 9 (CARD9). Par conséquent, les voies de signalisation TLR et NOD1/NOD2 recrutent TAK1, qui permet l'activation des voies NF- κ B et MAPK (ERK, JNK), entraînant ainsi la transcription de gènes pro-inflammatoires.

c. L'activation des NLR par les molécules microbiennes ou endogènes résulte en la formation de l'inflammasome. L'activation de la caspase 1 induit le clivage de la pro-IL-1 β inactive et la sécrétion de la forme mature IL-1 β .

ERK: extracellular signal-regulated protein kinase; IKK: I-kappa-B kinase; JNK: c-Jun N-terminal kinase; MKK: MAP kinase kinase; NEMO: NF- κ B essential modulator.



3.2.3. Les récepteurs de la famille des lectines de type C

Les récepteurs de la famille des lectines de type C (CLR) forment une famille hétérogène de protéines solubles et transmembranaires caractérisées par leur domaine lectine de type C. Parmi elles, les dectines, les collectines, les sélectines et les récepteurs des cellules Natural Killer (NK) sont importants pour la détection des signaux de danger. Les CLR se lient à un grand nombre de microorganismes dont les virus, les bactéries, les parasites ou les champignons, et permettent leur internalisation. Cette internalisation peut ainsi induire une signalisation intracellulaire suite à une reconnaissance *via* la dectin-1, la dectin-2, le récepteur mannose (DEC-205), la langérine, ou DC-SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3)-grabbing non-integrin, CD209) (Hardison and Brown, 2012).

Tandis que l'activation des collectines conduit à diverses réponses immunitaires comme l'activation du complément et la phagocytose, les sélectines sont des CLR décrits comme étant fortement impliqués dans le « homing » lymphocytaire (Ainscough *et al.*, 2012).

Les DC expriment un large répertoire de CLR. Ainsi le BDCA-2 est spécifique des pDC, la langérine est spécifique des LC (Valladeau *et al.*, 2000), et le DC-SIGN est exprimé sur les DC et les macrophages.

Une étude a mis en avant le rôle important des CLR dans la sensibilisation cutanée : Il a été montré *in vitro* que l'adénosine, produite par les Treg, diminue l'expression de l'E-Sélectine et de la P-Sélectine à la surface des LT effecteurs (Ring *et al.*, 2009). L'injection d'adénosine à des souris sensibilisées par la molécule allergisante TNCB mime les effets de l'injection de Treg et inhibe la réaction allergique en bloquant l'adhésion des LT sur l'endothélium (Ring *et al.*, 2009).

3.2.4. Les RLR et les ALR

Les RLR et les ALR sont des récepteurs importants dans la réponse anti-microbienne.

- Les récepteurs intracellulaires Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) (RLR) intracellulaires sont exprimés de façon ubiquitaire à faible niveau, et leur expression est induite par une infection virale ou par la présence d'interféron de type I. Les RLR détectent l'ARN viral présent dans le cytoplasme pour initier une réponse antivirale par la production d'IFN I et d'IFN III. Contrairement aux TLR, capables de détecter les PAMPs exogènes, les RLR ne détectent seulement que l'ARN viral cytoplasmique, et sont cruciaux dans l'induction et l'amplification d'une réponse antivirale.

- Enfin les récepteurs AIM-2 like (absent in melanoma) (ALR) forment une famille de 2 récepteurs : AIM2 et IFI 16 constitués d'un domaine N-terminal PYD et un ou deux domaines C-terminal IFN-inducible. AIM2 se lie préférentiellement à l'ADN double brin et est capable de recruter la protéine ASC pour former un inflammasome, et donc la production d'IL-18 et d'IL-1 β . IFI 16 peut détecter l'ADN double brin et l'ADN simple brin. Il conduit à l'activation de NF- κ B et d'IRF-3 et donc à la transcription de gènes impliqués dans l'immunité. Par ailleurs, IFI 16 est également capable de recruter la protéine ASC et de former un inflammasome.

Certaines molécules présentes dans l'environnement quotidien ou professionnel sont reconnues comme des signaux de danger et peuvent entraîner une activation inappropriée du système immunitaire et conduire au développement de certaines pathologies telles que l'eczéma allergique de contact.

II. L'eczéma allergique de contact

Au quotidien, nous sommes constamment exposés à une multitude de composés chimiques naturels ou synthétiques. Un grand nombre d'entre eux sont étrangers à notre organisme : ce sont les xénobiotiques. L'inhalation, l'ingestion ou l'exposition cutanée à ces xénobiotiques est la plupart du temps sans conséquence. Cependant, certains composés chimiques de faible poids moléculaire interagissent avec les cellules de l'organisme et peuvent perturber des processus biologiques. Certains xénobiotiques sont chimiquement réactifs, tandis que d'autres nécessitent une métabolisation pour devenir réactifs. Les effets de ces composés sont variés : ils peuvent avoir des effets toxiques, carcinogènes et/ou mutagènes, ou bien ils peuvent moduler le système immunitaire. Selon les propriétés chimiques du xénobiotique, son mécanisme d'action, ses tissus et cellules cibles ainsi que les voies de signalisation activées, l'exposition à ce dernier pourra conduire à des pathologies telles que l'eczéma allergique de contact (EAC), des maladies respiratoires ou auto-immunes (Martin *et al.*, 2011).

Les allergisants de contact sont des xénobiotiques dont le poids moléculaire est inférieur à cinq cents daltons. Parmi eux, on peut citer les ions métalliques tels que le nickel Ni^{2+} ou le cobalt Co^{2+} et leurs sels métalliques tels que le NiSO_4 et CoCl_2 , les fragrances, les colorants et les conservateurs. Les allergisants de contact sont responsables de l'EAC, également appelé dermatite allergique de contact. L'EAC est une maladie cutanée inflammatoire fréquente dépendante de l'immunité adaptative et caractérisée par des lésions érythémateuses prurigineuses. Il faut différencier l'EAC de la dermatite de contact d'irritation, cette dernière résultant en l'altération des kératinocytes et une inflammation locale due à l'effet toxique direct d'agents chimiques. En Europe, il est estimé qu'environ 20% de la population européenne développe un EAC (Peiser *et al.*, 2011).

1. Les molécules allergisantes cutanées

A ce jour, environ 4000 allergènes de contact sont connus (Martin, 2015). Le risque de développer un EAC dépend du schéma d'exposition et du mode de vie personnel et professionnel. En effet, l'exposition professionnelle à des allergènes de contact conduit

fréquemment au développement d'un EAC et est une cause majeure d'incapacité de travail, et est reconnue en tant que maladie professionnelle. Par ailleurs, les habitudes personnelles peuvent influencer le risque de développer cette pathologie. Par exemple, auparavant les femmes étaient plus fréquemment touchées par l'allergie au Ni^{2+} que les hommes car elles portaient plus des bijoux comportant du nickel. La directive de l'UE publiée en 1994 régule strictement les taux de Ni^{2+} dans les produits qui rentrent en contact avec la peau. Cette directive a résulté en une diminution des taux de sensibilisation au Ni^{2+} (Thyssen *et al.*, 2010). Etonnamment, les pièces d'euros contiennent cependant des hauts taux de Ni^{2+} .

Les aspects géographiques et législatifs influencent également l'exposition aux allergènes. Aux Etats-Unis, les plantes du genre *toxicodendron* sont très répandues et contiennent une substance allergisante : l'urushiol. L'EAC à ces plantes est fréquent aux Etats-Unis, tandis qu'il est négligeable en Europe.

La prévention et le traitement de l'EAC repose essentiellement sur l'identification de l'allergène de contact responsable et l'éviction de ce dernier ; c'est pourquoi il est essentiel d'avoir une bonne connaissance des différentes molécules chimiques en cause.

1.1. Les différents types d'haptènes

La plupart des composés chimiques organiques et inorganiques responsables d'EAC sont des composés de faible poids moléculaire (< 500 Da), appelés haptènes. Le concept de l'haptène a été introduit en 1936 par Landsteiner et Jacob (Landsteiner and Jacob, 1935). Etant trop petits pour être immunogènes, les haptènes doivent se lier à des protéines porteuses, appelées « carrier » pour former une structure antigénique reconnaissable par le système immunitaire adaptatif. Il existe trois types d'haptènes, qui seront détaillés ci-dessous (Figure 8).

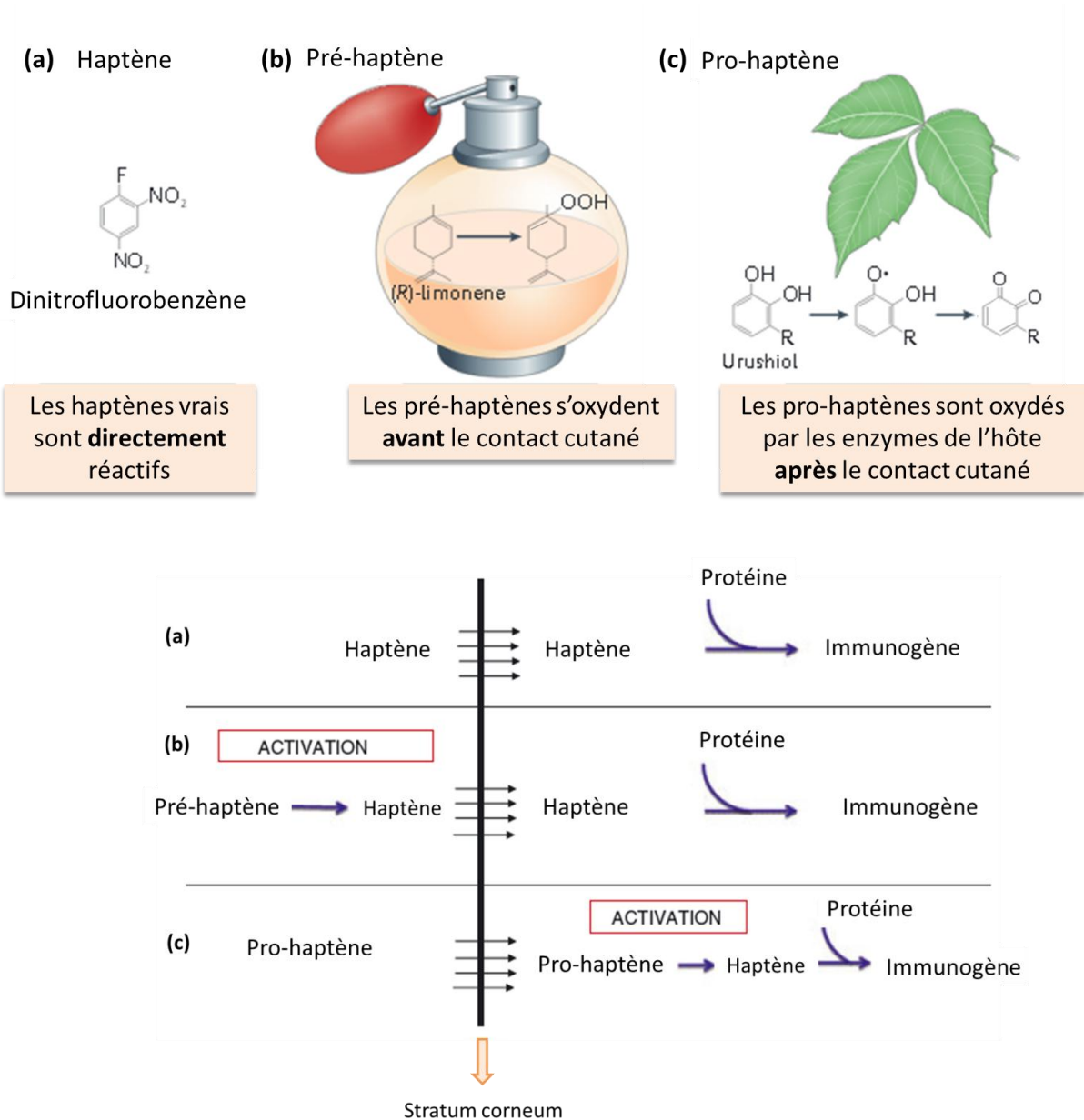


Figure 8. L'activation des différents types d'haptènes

D'après Kaplan *et al.*, 2012; Karlberg *et al.*, 2013

1.1.1. Les haptènes vrais

La grande majorité des haptènes vrais sont des molécules électrophiles intrinsèquement réactives qui sont capables d'induire un EAC en se liant de façon covalente aux résidus nucléophiles des protéines de l'environnement cutané (Figure 8a) (M Divkovic *et al.*, 2005). Parmi eux, les résidus électrophiles du DNFB, du 2,4-dinitrochlorobenzène (DNCB) et de l'hexylcinnamaldéhyde (HCA) se lient de façon covalente avec les résidus nucléophiles des protéines cutanées environnantes. Dix groupes électrophiles fonctionnels majoritaires

présents au sein des structures hapténiques sont décrits pour réagir avec les groupements nucléophiles (Figure 9).

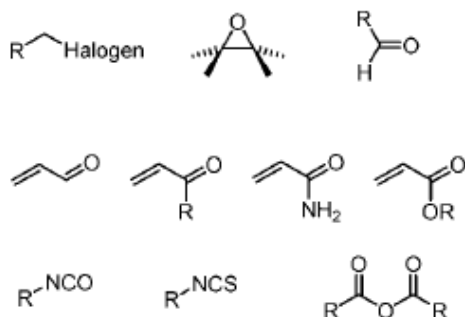


Figure 9. Exemples de groupes électrophiles fonctionnels retrouvés sur les haptènes et qui réagissent avec les résidus nucléophiles des protéines.

(Karlberg *et al.*, 2008)

1.1.2. Les pré-haptènes

Le terme de pré-haptène fut introduit en 2006 par JP Lepoittevin (Lepoittevin, 2006), définissant des molécules non intrinsèquement réactives transformées par des mécanismes non enzymatiques, l'oxydation à l'air ou photoactivation, en dérivés radicalaires très réactifs comme les hydroperoxydes (Figure 8b). L'oxydation à l'air (ou autooxydation) est une réaction en chaîne de radicaux libres dans laquelle la substitution d'atomes d'hydrogène combinée à l'addition d'atomes d'oxygène peut former des radicaux peroxy qui peuvent être stables et très réactifs (Karlberg *et al.*, 2013).

Des études ont investigué l'influence de l'autooxydation sur le potentiel allergisant de certains terpènes utilisés dans les fragrances et ont mis en évidence des positions allyles oxydables capables de générer des hydroperoxydes sous l'effet de l'air. Ces hydroperoxydes générés peuvent en outre être de nouveau oxydés pour former des produits d'oxydation secondaires générant *in fine* des composés polymères. Une fois les hydroperoxydes générés, ils peuvent former des antigènes spécifiques et agir comme allergisants cutanés (Christensson *et al.*, 2006). Les produits d'oxydation secondaires tels que les aldéhydes et les époxydes peuvent aussi être allergisants, augmentant ainsi le potentiel allergisant des mélanges d'autooxydation (Karlberg *et al.*, 2008). De nombreuses fragrances couramment utilisées ont été montrées comme étant des pré- ou des pro-haptènes, parfois même pouvant être à la fois pré- et pro-haptène (Tableau 8). En effet, bien que les mécanismes

soient assez différents, l'autooxydation et la bio-activation de certaines fragrances peuvent générer les mêmes produits (Karlberg *et al.*, 2013).

Fragrance	Activation par oxydation par l'air	Bioactivation (oxydation)
Alcool cinnamique	Oui	Oui
Eugénol	Non	Oui
Géraniol	Oui	Non
Géranial	Oui	Oui
Isoeugénol	Non	Oui
Limonène	Oui	Non
Linalool	Oui	Non
Actétate linalyl	Oui	Non
α -Terpinène	Oui	Oui

Tableau 8. Exemples de fragrances montrées expérimentalement comme étant pré- et/ou pro-haptènes.

D'après Karlberg *et al.*, 2013

Un autre exemple de pré-haptène est le *d*-limonène, présent dans les agrumes, peuvent être oxydés par l'air et générer divers produits tels que des hydroperoxydes allyliques allergisants (Figure 8b et 10) (M Divkovic *et al.*, 2005).

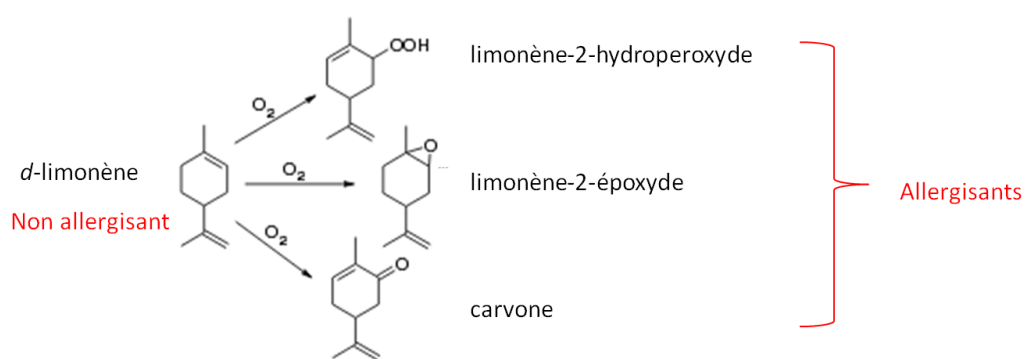


Figure 10. L'oxydation du *d*-limonène conduit à divers produits réactifs allergisants
(M Divkovic *et al.*, 2005)

1.1.3. Les pro-haptènes

Les pro-haptènes n'ont pas de réactivité chimique intrinsèque et ne sont donc pas capables de se lier aux protéines cutanées sans transformation ni bioactivation (Figure 8c). La peau humaine exprime des systèmes enzymatiques capables de métaboliser les xénobiotiques, en modifiant leur structure chimique afin d'augmenter leur hydrophilie pour en faciliter l'élimination du corps. Les enzymes cutanées de phase I initient la métabolisation des xénobiotiques et incluent les CYP450 (un système d'oxydation des composés), les alcool- et aldéhydes- déshydrogénases, les monoamines oxydases, les monooxygénases et les enzymes hydrolytiques (Karlberg *et al.*, 2013). Les cellules cutanées telles que les LC, les fibroblastes, les KC et les mélanocytes expriment de nombreux CYP450. Les kératinocytes expriment tout particulièrement les CYP1A1, 1B1, 2B6, 2E1 et 3A (Baron *et al.*, 2001) et les DC expriment les CYP1A1, 2D6, 2C9, 2C19, et 2E1 et constitutivement le CYP1B1 (Sieben *et al.*, 1999).

Les enzymes de phase II prennent généralement le relais de la métabolisation et l'élimination des produits générés par les enzymes de phase I. Elles sont également retrouvées dans la peau et incluent les acyltransférases, les glutathio-S-transférases, les UDP-glucuronosyltransférases et les sulfotransférases (Karlberg *et al.*, 2013). Ces enzymes de phase I et II peuvent être responsables de la formation d'intermédiaires très réactifs (Maja Divkovic *et al.*, 2005). Parmi eux, un célèbre exemple de pro-haptène peut être cité : l'alcool cinnamique, composant principal de la cannelle retrouvé dans les parfums, doit être métabolisé *in vivo* pour donner un composé très réactif vis-à-vis des résidus nucléophiles : l'aldéhyde cinnamique (Figure 11) (Smith *et al.*, 2000).

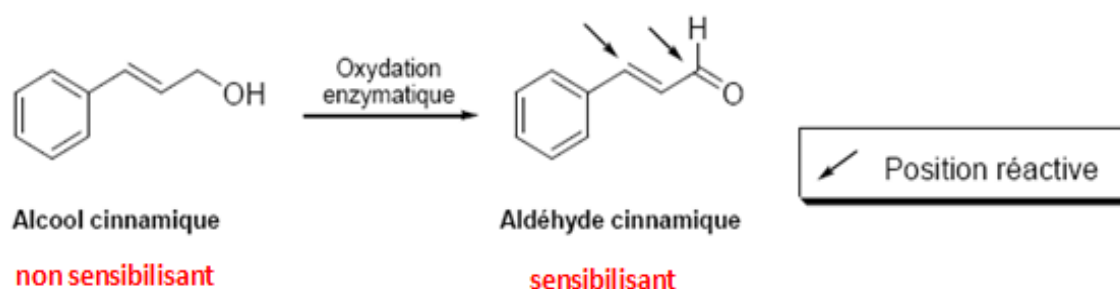


Figure 11. Oxydation de l'alcool cinnamique en aldéhyde cinnamique
(D Basketter *et al.*, 1995)

Par ailleurs, il a été montré que l'eugénol n'induit pas de réaction allergique chez les souris invalidées pour le gène du *cyp1A1*, démontrant l'importance des métabolites de l'eugénol générés par le CYP1A1 dans le processus de sensibilisation (Figure 8c) (Basketter *et al.*, 1996).

1.2. Pénétration percutanée des haptènes

La première étape clé dans l'initiation d'un EAC est la pénétration percutanée de l'haptène. Comme décrit dans la première partie, la peau, et plus particulièrement le *stratum corneum*, couche supérieure de l'épiderme, constitue la barrière protectrice qui sépare l'organisme de l'extérieur. La filaggrine (FLG), protéine présente dans le *stratum corneum*, a un rôle majeur dans la fonction de barrière de la peau. Il a été montré que l'absence ou la mutation de cette protéine conduit à l'altération de la fonction de barrière cutanée et est un fort facteur de prédisposition à l'allergie de contact chez la souris (Moniaga *et al.*, 2010) et chez l'Homme (Novak *et al.*, 2008). Les jonctions serrées, composées de diverses protéines telles que les claudines et occludines, forment une seconde barrière à la pénétration cutanée des antigènes (Honda *et al.*, 2012). Il a cependant été décrit que les LC activées peuvent allonger leurs dendrites à travers ces jonctions pour capturer les antigènes (Kubo *et al.*, 2009). Par ailleurs, le degré de perméabilité de la peau varie selon son état physiologique et selon les propriétés physico-chimiques des composés appliqués ; toute altération de la couche cornée entraîne une pénétration des substances exogènes (Honda *et al.*, 2012). Le vieillissement, l'irritation, la sécheresse et le stress altèrent l'état physiologique cutané et peuvent contribuer à la diminution de sa perméabilité (Proksch *et al.*, 2006).

En parallèle, les caractéristiques physico-chimiques des haptènes, à savoir leur poids moléculaire et leur lipophilie influencent leur pénétration cutanée : plus le poids est faible et la lipophilie élevée, plus l'haptène pénétrera l'épiderme rapidement. Les composés ionisés, quant à eux, pénètrent difficilement l'épiderme (Lepoittevin, 2006).

Un haptène peut pénétrer dans l'épiderme *via* deux voies : la voie intercellulaire (passage entre les cellules) et/ou la voie transcellulaire (passage au travers des cellules), plus rapide (Milpied-Homsy *et al.*, 2009). Les molécules de très petite taille évitent la couche lipidique et traversent l'épiderme en passant par les glandes sudoripares ou par les follicules pilo-sébacés.

C'est durant le passage à travers l'épiderme que les haptènes vont devenir immunogènes en se liant aux protéines de l'environnement cutané et générer des complexes pris en charge par les cellules de l'immunité.

1.3. Liaison des haptènes aux protéines cutanées environnantes

Par leur réactivité, les haptènes peuvent se lier à des protéines du soi pour former une structure antigénique reconnaissable par le système immunitaire. La réactivité chimique de ces composés envers les protéines est donc requise non seulement pour la formation d'épitopes reconnaissables par les LT (Martin, 2004), mais également pour l'activation du système immunitaire inné, indispensable à l'initiation d'un EAC (Martin, 2012). L'interaction entre l'haptène et les protéines se fait soit par des liaisons covalentes pour les molécules organiques, soit par des liaisons de coordination pour les ions métalliques.

1.3.1. Les liaisons de covalence

Les liaisons de covalence sont des interactions très stables entre les groupements nucléophiles des protéines et les groupements électrophiles des haptènes (Figure 12).

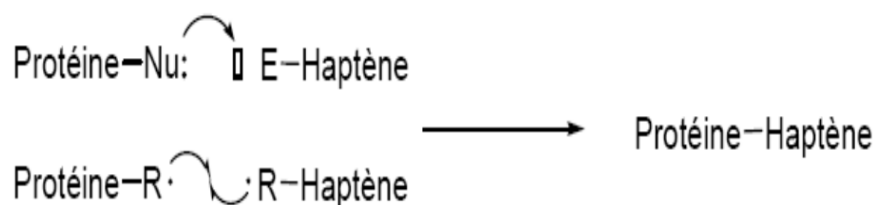


Figure 12. Les liaisons covalentes
(Aptula *et al.*, 2007)

Chimiquement, la peau peut être décrite comme un environnement nucléophile, riche en eau et en protéines dont les groupements nucléophiles sont riches en électrons (Karlberg *et al.*, 2008). Les groupements nucléophiles des protéines, tels les groupements thiols (-SH) des cystéines ou les groupements amines (-NH₂) des lysines, réagissent avec les groupements électrophiles des molécules allergisantes (M Divkovic *et al.*, 2005). Les groupements nucléophiles de la méthionine (-S-), la tyrosine (-OH) et l'histidine (=N-) peuvent également réagir avec les groupements électrophiles des haptènes (Karlberg *et al.*, 2008).

De façon générale, les haptènes ne réagissant pas par voie radicalaire lient les protéines selon 4 réactions principales (Figure 13) :

- une substitution nucléophile sur un centre saturé (Figure 13a)
- une substitution nucléophile sur un centre insaturé (Figure 13b)
- la formation d'une base de Schiff (Figure 13c)
- l'addition de Michael (Figure 13d)

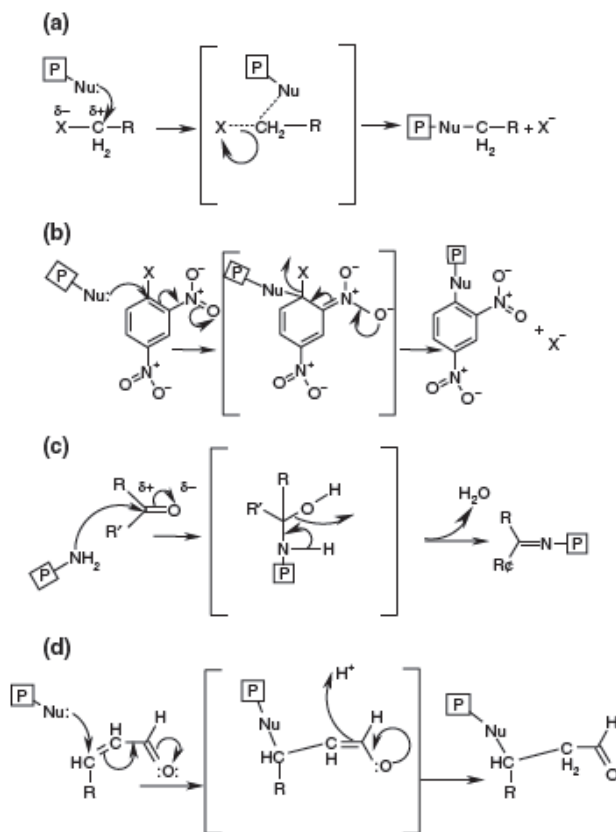


Figure 13. Réactions principales entre les haptènes et les protéines

(M Divkovic *et al.*, 2005)

[Nu : nucléophile ; P : protéine ; X : groupe partant]

(a) substitution nucléophile sur un centre saturé, (b) substitution nucléophile sur un centre insaturé, (c) formation d'une base de Schiff, (d) Addition de Michael

1.3.2. Les liaisons de coordination

Les métaux tels que le nickel (Ni), le chrome, le béryllium, le platine et le cobalt réagissent avec les protéines *via* des liaisons de faible affinité et réversibles avec 4 ou 6 électrons donneurs : les liaisons de coordination (Figure 14). Les électrons donneurs sont

essentiellement fournis par les atomes d'oxygène, d'azote ou de soufre des protéines (Chipinda *et al.*, 2011).

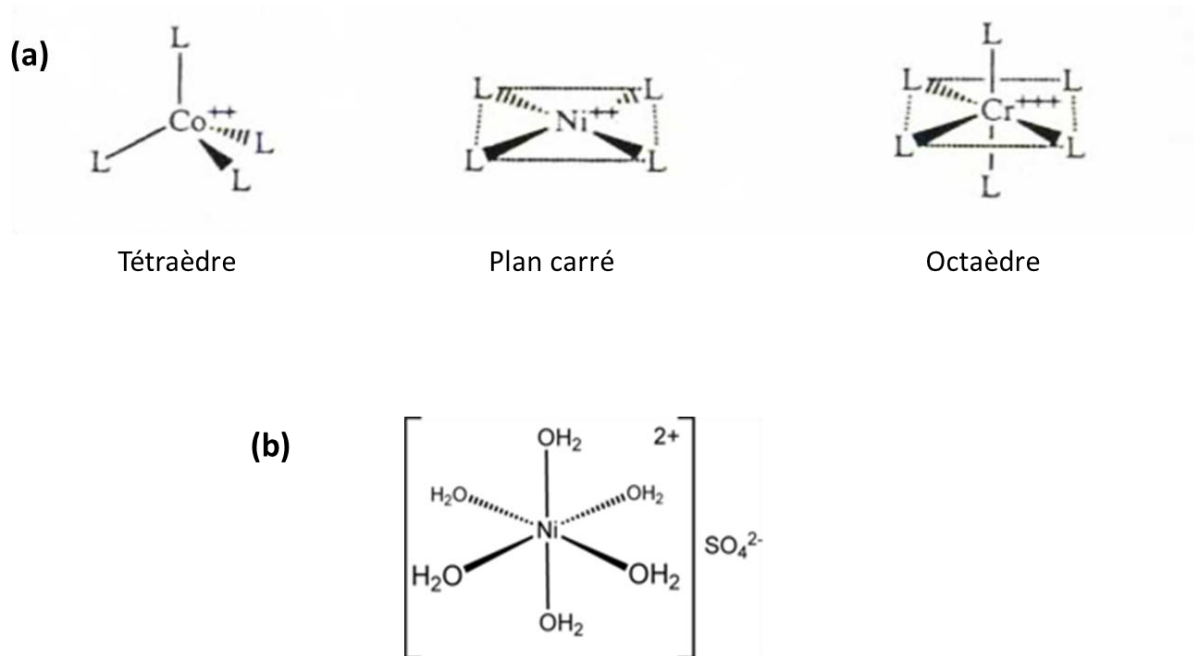


Figure 14. Exemples de liaisons de coordination effectuées par les métaux

D'après D. Basketter *et al.*, 1995

a. Le Cobalt (Co⁺⁺) forme un tétraèdre, le nickel (Ni⁺⁺) un complexe en plan carré alors que le chrome Cr⁺⁺⁺ forme un octaèdre. [L= ligand]

b. Le sulfate de nickel NiSO₄.

Ces liaisons de coordination sont cependant suffisamment stables pour former un complexe reconnaissable et pris en charge par le système immunitaire (Thierse *et al.*, 2005). Il a par ailleurs été montré que le Ni pouvait se lier directement aux peptides du CMH II des DC permettant ainsi une différenciation de LT spécifiques du Ni (Romagnoli *et al.*, 1991; Van Den Broeke *et al.*, 1999), mais également le Ni peut lier le CMH et la tyrosine 29 de la chaîne α du TCR des LT, formant un « pont » entre les deux cellules (Gamerding *et al.*, 2003).

Une fois le complexe haptène-protéine formé, les systèmes immunitaires inné et adaptatif vont reconnaître le néo-antigène ainsi généré pour induire une réponse immune spécifique de l'haptène.

Deux phases spatio-temporelles distinctes sont nécessaires pour développer un EAC : la phase de sensibilisation (ou afférente) et la phase d'élicitation (ou efférente) (Figure 15). Il existe une troisième phase, encore méconnue : la phase de régulation/résolution de la réponse inflammatoire (Vocanson *et al.*, 2009).

Cependant, il a été démontré qu'un EAC pouvait survenir suite à un contact unique avec un haptène fort chez des patients non-sensibilisés auparavant : il s'agit d'un EAC primaire. Les phases de sensibilisation et d'élicitation d'un EAC primaire peuvent être induites après une seule exposition à un haptène tel que le DNFB du fait de la persistance de celui-ci durant une longue période, permettant l'activation et le recrutement de LT CD8⁺, activés dans les organes lymphoïdes quelques jours auparavant (Saint-Mezard *et al.*, 2003). Des patients ont développé un EAC primaire suite à une exposition accidentelle unique à la résine diglycidylether du bisphénol A, au méthyl acrylate ou à la résine phénol-formaldéhyde (Kanerva *et al.*, 1994).

L'EAC est un terme clinique utilisé pour décrire la réaction inflammatoire cutanée, tandis que l'hypersensibilité de contact (HSC) désigne le modèle expérimental pour l'étude de l'EAC humain. Le test permettant d'étudier l'HSC est le Mouse Ear Swelling Test (MEST) et est effectué sur des souris. Un sensibilisant est appliqué sur la peau rasée de l'abdomen de la souris 1 ou 3 jours consécutifs : il s'agit de la phase de sensibilisation de l'HSC. Cinq jours après, l'élicitation est induite par l'application du même composé au niveau de l'oreille. Le gonflement de l'oreille entraîné, mesuré par un micromètre, est corrélé avec l'intensité de la réponse effectrice générée (Kaplan *et al.*, 2012).

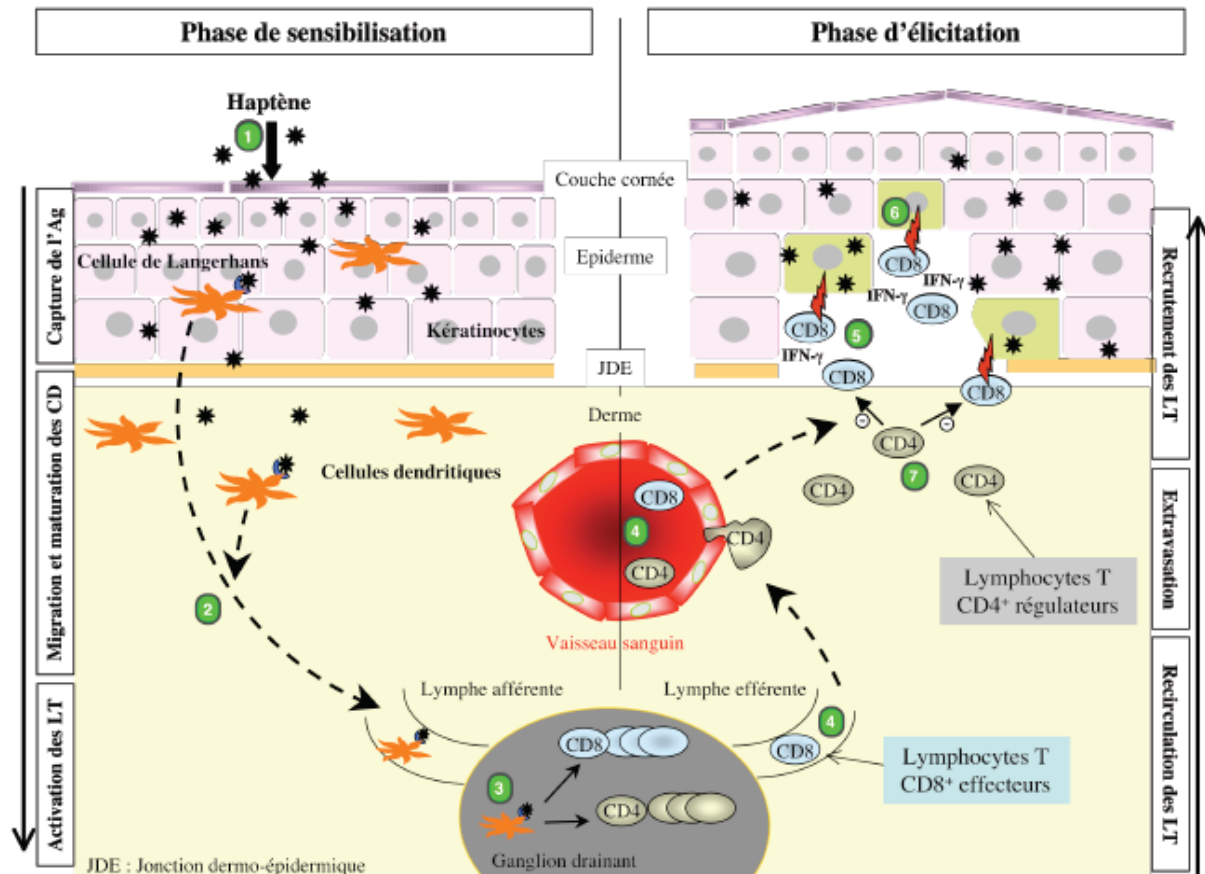


Figure 15. Mécanismes d'activation de la réponse cellulaire par les haptènes

D'après Saint-Mezard *et al.*, 2004

L'application épicutanée d'une molécule sensibilisante induit une activation du système immunitaire inné cutané (étape 1) associée à la migration et la maturation des cellules de Langerhans (LC) et des cellules dendritiques (DC) du derme qui présentent l'haptène en tant qu'Ag aux LT dans le ganglion drainant (étape 2). Ces DC activent des populations de LT spécifiques CD8⁺ effectrices et CD4⁺ régulatrices (étape 3) qui vont ensuite re-circuler en périphérie (étape 4). Lors d'un deuxième contact avec le même haptène, les LT CD8⁺ spécifiques sont recrutés dans la peau et activés (étape 5). De par leur cytotoxicité et leur production d'IFN γ , les LT CD8⁺ effecteurs sont responsables de la mise en place de l'inflammation et de la lésion d'eczéma (étape 6) qui va être résolue lors de l'arrivée secondaire de LT CD4⁺ régulateurs sécrétant des cytokines anti-inflammatoires (étape 7).

2. Physiopathologie de l'eczéma allergique de contact : la phase de sensibilisation

2.1. Reconnaissance des haptènes par l'immunité innée

2.1.1. Orchestration de la réponse immunitaire innée moléculaire : activation des voies de signalisation

Il est désormais acquis que la seule présence d'un Ag étranger à l'organisme est insuffisante pour déclencher une réponse immunitaire adaptative. L'activation du système immunitaire inné est également requise (Kaplan *et al.*, 2012). Ceci est possible par le potentiel irritant des haptènes. Les propriétés irritantes d'un composé chimique peuvent causer une inflammation cutanée visible après une seule exposition *via* l'activation du système immunitaire inné, participant ainsi à l'induction d'un EAC (Grabbe *et al.*, 1996).

Les allergisants de contact activent les voies de signalisation du système immunitaire inné de manière directe et indirecte (Figure 16). Les haptènes métalliques comme le Co^{2+} et le Ni^{2+} lient directement le TLR4 humain et en activent la signalisation subséquente (Raghavan *et al.*, 2012). D'autres allergisants de contact tels que le TNCB ou l'oxazolone induisent la génération de fragments d'acide hyaluronique qui activent les TLR2 et TLR4 (Esser *et al.*, 2012). La signalisation induite par les TLR activés et leurs protéines adaptatrices Myd88 et Trif va conduire à l'activation de NF- κ B, des MAPK, et des IRF 3 et 7, ainsi qu'à la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (Figure 16). Par ailleurs, les allergisants de contact vont générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la libération d'ATP. Les ERO contribuent à la dégradation de l'acide hyaluronique de la MEC et génèrent des fragments pro-inflammatoires importants pour l'activation et la migration des DC (Muto *et al.*, 2014). D'autre part, les produits chimiques génèrent des ERO qui augmentent l'activité des hyaluronidases via p38 MAPK participant à la génération de fragments d'acide hyaluronique (Monzon *et al.*, 2010). De plus, les ERO promeuvent la signalisation des TLR ainsi que l'activation de l'inflammasome, conduisant à la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 (Martinon, 2010; Matsuzawa *et al.*, 2005). L'ATP généré par les cellules cutanées au contact des molécules allergisantes active le récepteur P2X7 qui participe également à l'activation de l'inflammasome. Tous ces mécanismes sont nécessaires à l'activation des DC et permettent de déclencher la phase de sensibilisation (Martin, 2015).

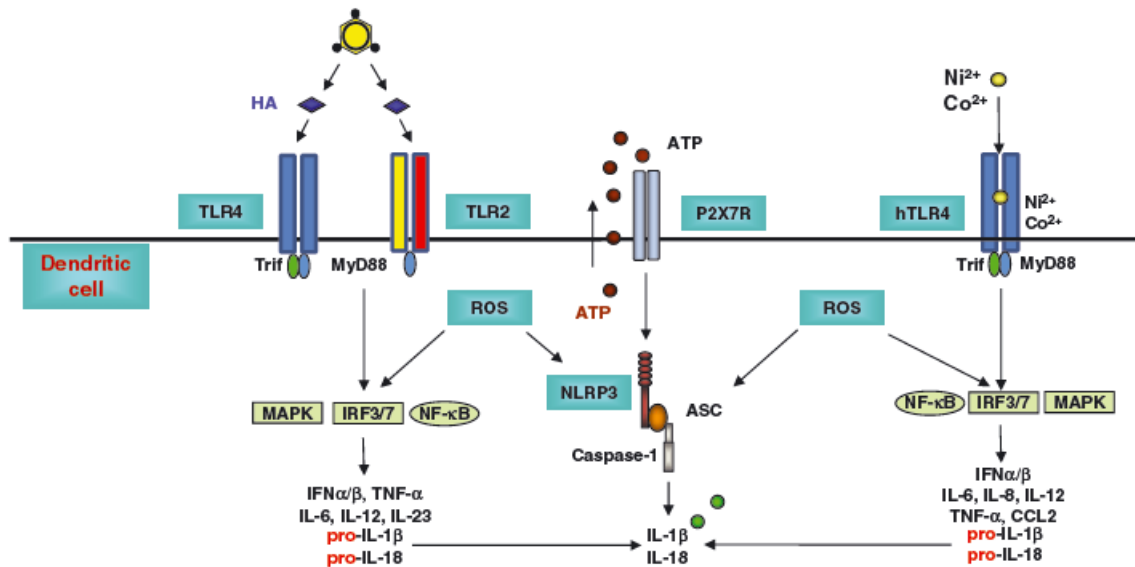


Figure 16. Activation directe et indirecte des voies de signalisation du système immunitaire inné (Martin, 2015).

2.1.2. Orchestration de la réponse immunitaire innée cellulaire

Parmi les événements précoces lors de l'initiation d'un EAC, l'activation des **mastocytes** joue un rôle important (Dudeck *et al.*, 2011). Par un mécanisme encore inconnu aujourd'hui, les allergisants de contact entraînent l'activation des mastocytes qui vont dès lors sécréter de l'histamine. L'histamine agit ainsi sur les cellules endothéliales, augmentant la perméabilité vasculaire et permettant l'infiltration de polynucléaires neutrophiles (PN) (Biedermann *et al.*, 2000). La déplétion des mastocytes avant la sensibilisation par injection de toxine diphtérique (DT) à des souris *Mcpt5-Cre* croisées avec la lignée iDTR surexprimant le récepteur à la DT, l'HSC au DNFB est fortement réduite en comparaison avec les souris sauvages (Dudeck *et al.*, 2011). De même, les souris *Mcpt5-Cre* croisées avec la lignée R-DTA exprimant la DT sont constitutivement déficientes en mastocytes et développent une HSC réduite en comparaison aux souris sauvages en réponse au DNFB (Dudeck *et al.*, 2011). De plus, la présence des mastocytes est requise pour le recrutement des PN (Weber *et al.*, 2014).

Les PN sont également des cellules effectrices de l'immunité innée importantes pour le développement d'une HSC. De même que les mastocytes, les PN sont requis pour initier la sensibilisation : la déplétion de neutrophiles par l'injection d'un anticorps anti-Ly6G inhibe le développement d'une HSC en réponse au TNCB (Weber *et al.*, 2014). La protéine anti-

apoptotique Mcl1 est requise pour la survie des PN. Les souris délétées de façon conditionnelle pour Mcl1 spécifiquement dans les cellules myéloïdes sont déficientes en neutrophiles. Ces souris ne développent pas d'HSC en réponse au TNCB, et la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β dans les tissus de l'oreille est plus faible. De plus la migration des DC jusque dans les ganglions drainants est fortement diminuée (Weber *et al.*, 2014). Enfin, la déplétion des PN avant l'élicitation altère le recrutement de LT CD8⁺ (Engeman *et al.*, 2004).

Bien qu'il ait été montré récemment que les **NK** possèdent des propriétés de cellules de l'immunité adaptative (Paust *et al.*, 2010b), ce sont des cellules de l'immunité innée retrouvées dans la peau murine et humaine en présence d'une HSC. Ce sont des cellules pro-inflammatoires capables de rapidement produire de l'IFN γ , amplifiant ainsi la réponse T (Carbone *et al.*, 2010). Une sous-population de NK hépatiques CD49a⁺DX5-NK est recrutée au niveau cutané et induit une HSC à l'oxazolone chez la souris (Peng *et al.*, 2013). Les souris déficientes en LT et LB (souris invalidées pour le gène *recombination activating gene [rag]* : *rag*^{-/-}) développent un HSC en réponse aux haptènes tels que le DNFB ou l'oxazolone, contrairement aux souris déficientes en LT, LB et NK (O'Leary *et al.*, 2006). De plus, des transferts adoptifs de NK isolés de souris *rag*^{-/-} sensibilisées par le DNFB et transférées à des souris *rag*^{-/-} naïves entraînent le développement d'une HSC (O'Leary *et al.*, 2006). Les NK sont donc nécessaires et suffisants pour développer une HSC. Ceci suggère que ces souris développent une mémoire immunologique spécifique de l'haptène *via* les NK (Paust *et al.*, 2010a, 2010b). Une fois activés, les NK exercent leurs fonctions cytotoxiques contre les cellules cibles (infectées ou transformées) et produisent diverses cytokines pro-inflammatoires telles que MIP-1 α , TNF α et IL-22.

D'autre part, la phase précoce de l'initiation d'une HSC implique l'activation CD1d-dépendante des cellules NKT hépatiques par l'accumulation de lipides stimulateurs dans le foie après un contact de la peau avec l'allergisant cutané Trinitrophenyl chloride (TNP-Cl) (Dey *et al.*, 2011). Les NKT produisent de l'IL-4 tandis que les cellules stromales et les mastocytes produisent de l'IL-33. Ceci conduit à l'activation des cellules B-1, impliquées tant dans l'initiation que dans la régulation de l'HSC (Komai-Koma *et al.*, 2011). Les LT $\gamma\delta$ semblent également requis pour l'initiation d'une HSC (Askenase *et al.*, 2011), et leur capacité à

produire de l'IL-17 ainsi que leur forte présence dans la peau en fait des bons candidats pour initier l'inflammation (Cai *et al.*, 2011).

Les monocytes sont aussi recrutés sur le site d'une inflammation, et exercent diverses fonctions immunitaires : ils assurent le renouvellement des LC activées ayant quitté l'épiderme, et sont les précurseurs des DC inflammatoires et des macrophages (Merad *et al.*, 2013). Les monocytes interviennent dans la réponse inflammatoire par leur production de cytokines comme le TNF α , l'IL-1 β , et l'IL-6 (Danis *et al.*, 1995). La sensibilisation de souris par injection intraveineuse d'IgE anti-TNP et l'élicitation le jour suivant par une injection intradermale de TNP conjugué à l'albumine conduit à une inflammation chronique allergique. Dans ce modèle, les monocytes inflammatoires CCR2⁺ sont recrutés dans les lésions cutanées d'origine allergique. Cependant, la réaction allergique chez des souris invalidées pour *ccr2* est majorée en comparaison avec les souris sauvages et le recrutement des monocytes est altéré, suggérant un rôle anti-inflammatoire de ces monocytes. En effet, les basophiles sécrètent de l'IL-4 promouvant la différenciation des monocytes en macrophages de type M2 au phénotype anti-inflammatoire (Egawa *et al.*, 2013).

2.1.3. Signalisation par libération de médiateurs moléculaires

Dans un contexte inflammatoire, les cellules de la peau communiquent avec les autres acteurs du système immunitaire par la libération de cytokines (Figure 17).

Les KC ont un rôle crucial dans l'initiation de l'inflammation *via* la sécrétion d'IL-24 suite à l'activation du récepteur au TNF (TNF-R) (Pasparakis *et al.*, 2014). L'épiderme met en place un gradient d'IL-34 et de Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) qui va attirer les progéniteurs sanguins des LC, permettant ainsi leur renouvellement après qu'ils aient quitté l'épiderme suite à la capture de l'haptène (Wang *et al.*, 2012). Concomitamment, les DC, les KC et les fibroblastes produisent des cytokines de la famille de l'IL-1 et du TNF, qui participent à l'activation et à la migration des DC en diminuant l'E-cadhérine à leur surface ce qui rompt leur adhésion aux KC.

Cependant, le derme et l'épiderme ne produisent pas uniquement des cytokines pro-inflammatoires : la sécrétion d'IL-4 par les basophiles permet de polariser les macrophages tolérogènes M2 qui vont produire les cytokines anti-inflammatoires IL-10, du TGF β , ainsi que du VEGF (Figure 17). L'IL-4 permet également de réduire l'expression du TNF-R impliqué

dans l'activation et la migration des DC. Le TGF β augmente l'expression de l'E-cadhérine et diminue CCR7 inhibant ainsi la maturation et la migration des DC (Pasparakis *et al.*, 2014).

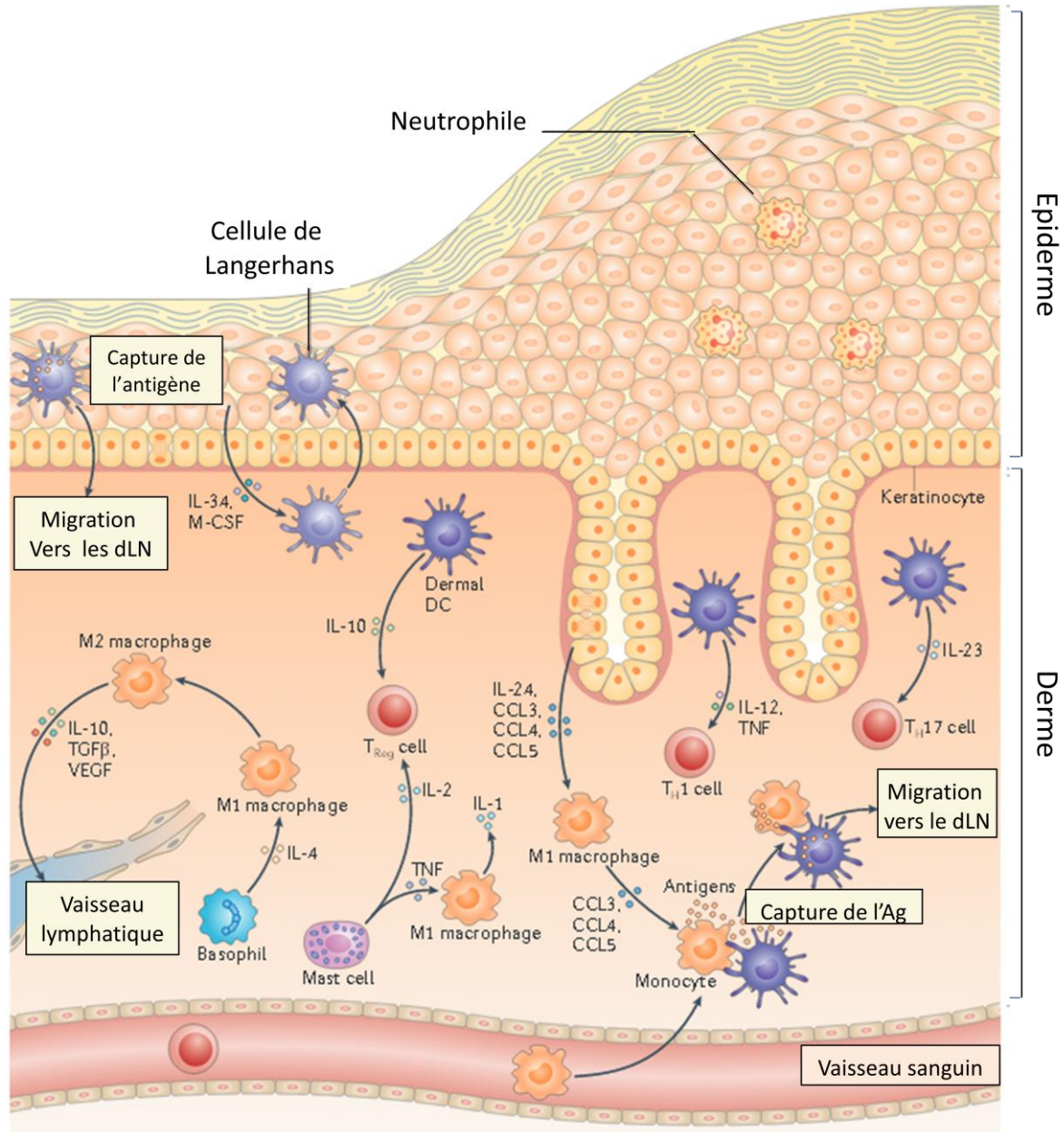


Figure 17. Médiateurs de la réponse immunitaire cutanée

D'après Pasparakis *et al.*, 2014

L'ensemble de ces médiateurs va conduire à l'activation du système immunitaire adaptatif, et ceci est possible par l'activation des DC. Après la capture de l'haptène, les DC vont migrer jusqu'aux ganglions drainants (dLN) où elles vont présenter l'haptène aux LT naïfs et ainsi initier une réponse lymphocytaire T spécifique de l'haptène. Les DC vont sécréter diverses

cytokines qui vont orienter la prolifération et la polarisation des LT, ceci sera détaillé dans la partie II.2.3.

2.2. Rôle des DC dans l'EAC : de l'immunité innée à l'immunité adaptative

Parmi les différentes populations de DC existantes, les LC et les DDC sont majoritairement impliquées dans l'induction d'un EAC. L'activation de ces dernières par un haptène déclenche la phase de sensibilisation de l'EAC.

2.2.1. Activation des DC

Comme décrit précédemment, les DC peuvent être activées de manière directe ou indirecte par les haptènes (Figure 16 et Figure 18).

L'activation indirecte met en jeu les TLR et les NLR, par la reconnaissance de DAMP ou de PAMP (Honda *et al.*, 2012), tandis que la génération d'ERO et d'ATP par les haptènes participent à l'activation de l'inflammasome directement dans les DC (Esser *et al.*, 2012).

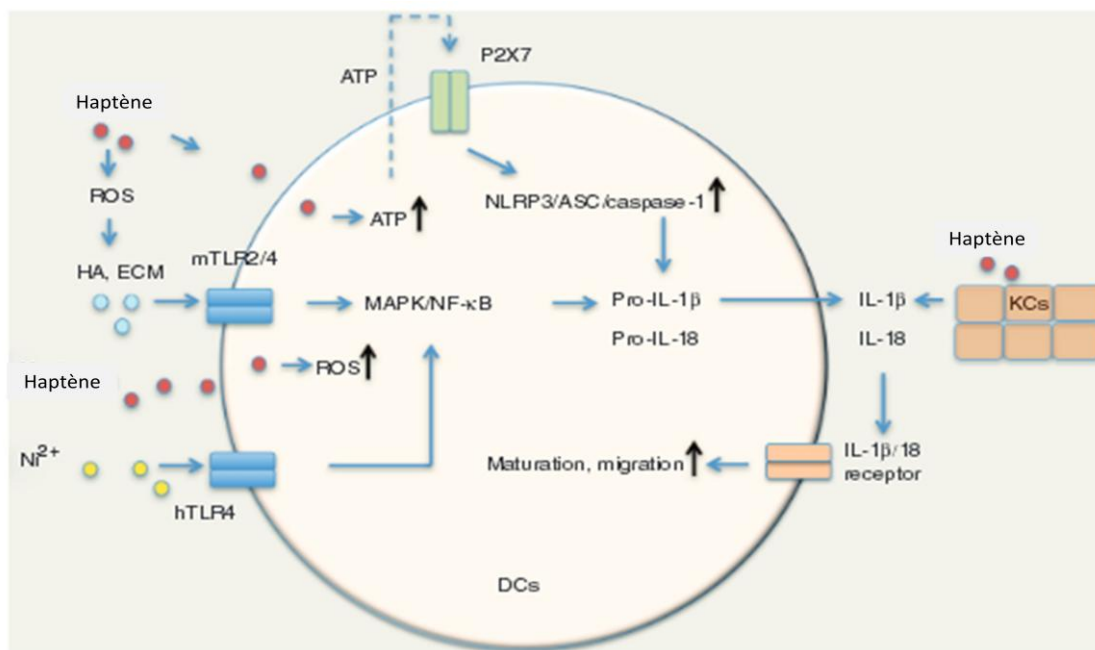


Figure 18. Activation des DC par les molécules allergisantes
(Honda *et al.*, 2012)

Chez l'Homme, le Ni^{2+} peut se fixer directement aux résidus histidine du TLR4, entraînant le développement d'un EAC (Schmidt *et al.*, 2010). D'autre part, il a été montré chez la souris

qu'une déficience du gène *nlrp12*, membre de la famille des NLR, altérerait la migration des DC jusqu'aux ganglions lymphatiques et entraînerait une diminution de l'HSC en réponse à l'oxazolone ou à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (Arthur *et al.*, 2010).

Les DC stimulées par les molécules allergisantes, contrairement aux molécules irritantes, vont acquérir un phénotype dit mature, par l'augmentation de l'expression du CMH II, des molécules de co-stimulation CD80 et CD86, et des molécules d'activation CD40 et CD83 (Aiba *et al.*, 1997). Les DC activées par les molécules allergisantes vont également sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-8 et le TNF α (Aiba *et al.*, 1997). L'acquisition de ces différents caractères phénotypiques est sous le contrôle de diverses voies de signalisation. De nombreuses études ont mis en évidence que la voie NF- κ B, ainsi que la voie des MAPK jouent un rôle particulièrement important dans l'activation des DC en réponse aux molécules allergisantes. Il existe trois voies principales des MAPK distinctes : p38 MAPK, Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK) et c-Jun N-terminal kinases (JNK).

Des voies différentes seront activées en fonction de la nature de l'haptène. Ainsi, dans les DC humaines issues de monocytes (MoDC) stimulées par du DNCB, l'expression du CMH II, de CD86, CD83 ainsi que la production d'IL-8 est sous le contrôle de p38 MAPK. Des MoDC stimulées avec du NiCl₂ expriment CD83 et produisent de l'IL-12p40 dépendamment de p38 MAPK, mais leur production de TNF α et d'IL-1 β est contrôlée par ERK (Aiba *et al.*, 2003). Tout comme le NiCl₂, il a été montré que le NiSO₄ active la voie NF- κ B et la voie des MAPK dans les MoDC et dans les DC différenciées à partir de progéniteurs de sang de cordon (CD34-DC) (Ade *et al.*, 2007; Aiba *et al.*, 2003; Arrighi *et al.*, 2001; Boislevé *et al.*, 2005, 2004). L'acquisition de CD86, CD83, CCR7 en réponse au NiSO₄ est contrôlée par p38 MAPK, JNK et ERK, tandis que l'expression du CMH II et la production d'IL-6, d'IL-8 et d'IL-12p40 sont contrôlées par la voie NF- κ B (Ade *et al.*, 2007; Boislevé *et al.*, 2005, 2004). Antonios et collaborateurs ont mis en évidence que les haptènes métalliques CoCl₂ et NiSO₄ activent des voies similaires dans les CD34-DC, mais que ces voies ont des rôles différents dans l'activation des DC (Antonios *et al.*, 2009). Ainsi, p38 MAPK contrôle l'expression de CD86 et CD83 en réponse au NiSO₄ et l'expression de CD83 en réponse au CoCl₂. La production d'IL-6 par ces deux haptènes dépend de toutes les MAPK, mais la production d'IL-12p40 en réponse au NiSO₄ est régulée positivement par p38 MAPK et JNK, tandis que ERK semble avoir un rôle inhibiteur (Antonios *et al.*, 2009).

2.2.2. Capture antigénique

La capture des antigènes repose sur les processus d'endocytose, permettant d'internaliser les Ag à la surface de la membrane cellulaire. Il existe différents types d'endocytose, qui varient selon la taille des éléments à internaliser. La phagocytose permet l'internalisation des particules de grande taille, des corps apoptotiques et des débris cellulaires ; la macropinocytose permet l'internalisation des particules entre 0,2 et 10 μm et l'endocytose concerne les particules de taille inférieure à 500 nm (Kumari *et al.*, 2010). Bien que la macropinocytose soit stimulée par les facteurs de croissance chez les macrophages et les cellules épithéliales, elle est constitutive dans les DC immatures et dépend uniquement du cytosquelette (Lanzavecchia, 1996). Contrairement à la macropinocytose, la phagocytose requiert la reconnaissance de la particule à internaliser. Les cellules peuvent phagocyter *via* différents récepteurs : les récepteurs Fc, les récepteurs du complément et les récepteurs des lectines (CLR). Les DC ont la capacité de capturer les Ag en utilisant simultanément les mécanismes de phagocytose et macropinocytose (Kato *et al.*, 2000; Sallusto *et al.*, 1995). La capture des Ag est différente selon les sous-populations de DC. Il a été montré *in vitro* que les LC ont une faculté d'internalisation des Ag supérieure à celle des DDC. Les LC sont par ailleurs capables de capturer les Ag nanoparticulaires appliqués à la surface cutanée (Vogt *et al.*, 2006). Cependant, lors d'une injection intradermique, l'Ag est majoritairement pris en charge par les DDC, présentes au niveau du site d'injection (Bond *et al.*, 2009).

Bien que plusieurs populations cellulaires soient capables de capturer des Ag (DC, LB, macrophages, KC), seules les DC peuvent assurer leur transport jusqu'aux dLN afin de les présenter aux LT naïfs et induire une réponse immunitaire primaire.

2.2.3. Migration des DC et transport des antigènes

Deux cytokines principales déclenchent la mobilisation des DC : le $\text{TNF}\alpha$ et l' $\text{IL-1}\beta$ (Figure 18). La seule présence d'une de ces deux cytokines induit la migration des DC, malgré l'absence d'autre *stimulus* (Cumberbatch *et al.*, 1997). Par ailleurs, l' $\text{IL-1}\beta$ et le $\text{TNF}\alpha$ participent à la diminution de l'expression de la E-cadhérine à la surface des LC, molécule d'adhésion qui permet leur interaction avec les KC et leur rétention dans l'épiderme (Tang *et al.*, 1993). En parallèle, l'expression de CCR7, récepteur des chimiokines CCL19 et CCL21, est augmentée (Jiang *et al.*, 2007). CCL-19 est produite par les zones T des dLN, et CCL-21 est produite par les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques et les cellules stromales. Ces deux

chimiokines concourent donc à attirer les DC au niveau des dLN où elles vont pouvoir interagir avec des LT naïfs (Förster *et al.*, 1999). Les LC activées produisent également des enzymes protéolytiques MMP-2 et MMP-9, qui vont leur permettre de traverser l'épiderme et de dégrader le collagène du derme afin de faciliter la migration interstitielle des LC et des DDC vers les vaisseaux lymphatiques (Ratzinger *et al.*, 2002). Ce processus est dépendant de l'axe CXCL-12-CXCR-4 (Figure 19). CXCR-4 est un récepteur exprimé sur la DC, tandis que CXCL12 est produit par les fibroblastes pour permettre la migration des LC de l'épiderme jusqu'au derme (Ouwehand *et al.*, 2008). Cette étape supplémentaire pourrait expliquer que les LC arrivent aux dLN environ 48h à 72h après reconnaissance de l'Ag, tandis que les DDC arrivent précocement (environ 24h après) (Kissenpfennig *et al.*, 2005). Une fois dans les vaisseaux lymphatiques, les DC sont transportées par le flux de lymphe afférente et arrivent au niveau du sinus sous-capsulaire du dLN. A l'intérieur du dLN, leur localisation sera déterminée par deux gradients distincts de chimiokines : CXCL-13, synthétisée par les DC folliculaires, oriente les DC vers les follicules B, tandis que les fibroblastes réticulaires sécrètent CCL19/CCL21 orientant les DC vers le paracortex riche en LT (Figure 19) (Förster *et al.*, 2012).

Les neutrophiles et les monocytes sont également capables d'assurer le transport antigénique après vaccination, comme le vaccin BCG (Bacille de Calmette Guérin), jouant ainsi un rôle important dans la dissémination antigénique vers les dLN ou la moelle osseuse (Abadie *et al.*, 2005).

Enfin, il semble que certains antigènes solubles et de taille inférieure à 70 kDa puissent diffuser librement dans les vaisseaux lymphatiques. Chez la souris, les Ag solubles transportés librement dans le dLN sont rapidement pris en charge et présentés par les DC résidentes dans le dLN (Sixt *et al.*, 2005).

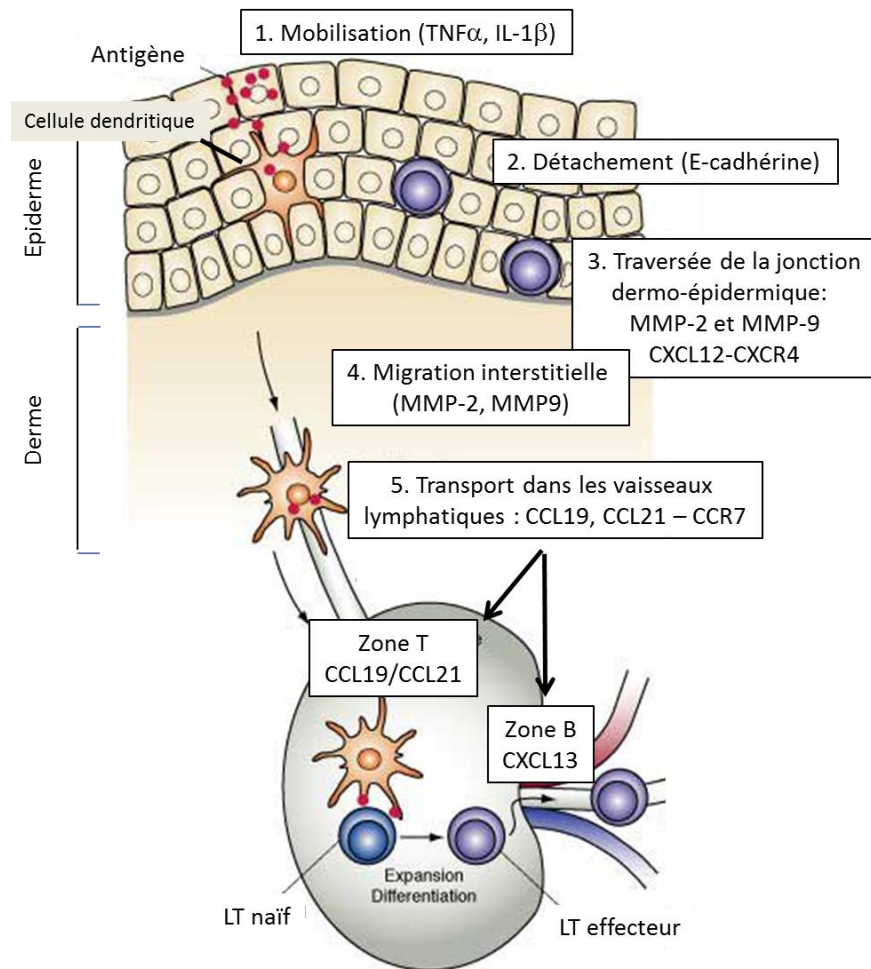


Figure 19. Les étapes clé de la migration des DC vers les ganglions lymphatiques

D'après la thèse de Biliana Todorova, 2014

2.2.4. Présentation antigénique

Selon sa nature, un antigène sera présenté aux LT différemment. En général, les Ag intracellulaires cytoplasmiques ou nucléaires seront présentés *via* le CMH de classe I aux LT CD8^+ , tandis que les Ag exogènes tels que les haptènes seront présentés par le CMH de classe II aux LT CD4^+ (Figure 20). Toutes les cellules nucléées expriment le CMH I mais seules les CPA (macrophages, DC, LB), expriment constitutivement le CMH II.

Les Ag cytoplasmiques ou nucléaires sont ubiquitinés et dégradés en peptides par le complexe du protéasome, complexe protéique à l'activité protéolytique, ou par d'autres protéases telles que les cathepsines (Figure 20A) (Neefjes *et al.*, 2011). Les fragments peptidiques sont ensuite transportés par des protéines de transport TAP (transporter associated with antigen processing) jusque dans le réticulum endoplasmique (RE). La

synthèse et l'assemblage de la chaîne α du CMH I et de la bêta-2-microglobuline (β_2m) ont lieu au sein du RE, et forment un complexe stable avec le peptide. Ce complexe sera ensuite transporté à travers l'appareil de Golgi à la surface cellulaire pour être présenté aux LT CD8⁺ (Neefjes *et al.*, 2011).

Les Ag exogènes, quant à eux, sont internalisés par endocytose par les CPA et fragmentés par des protéases dans l'endosome (Figure 20B). Les chaînes alpha et beta du CMH II, ainsi qu'une chaîne invariante, sont synthétisées et assemblées dans le RE, avant d'être transportées à travers l'appareil de Golgi au sein de l'endosome. C'est dans ce dernier que les molécules de CMH II vont être chargées avec des peptides avant d'être transportées et exprimées à la surface des cellules pour interagir avec les LT CD4⁺ (Neefjes *et al.*, 2011).

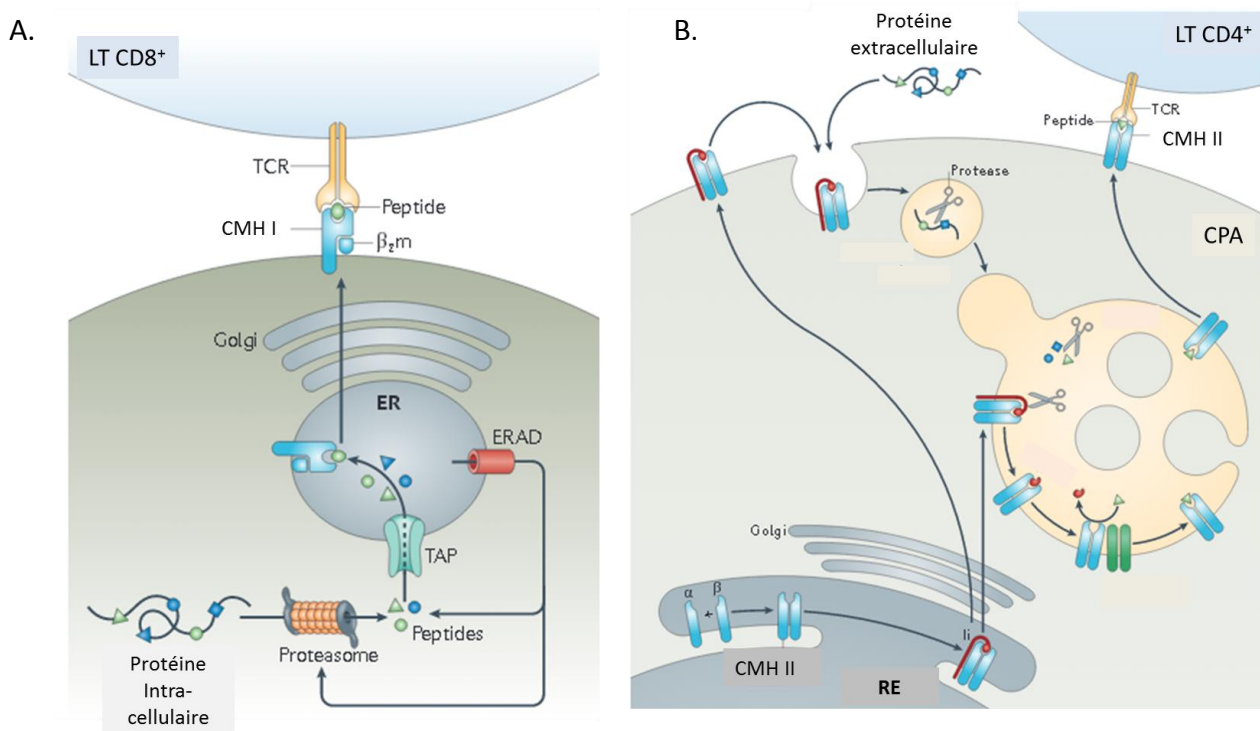


Figure 20. Présentation des Ag par les DC

D'après Neefjes *et al.*, 2011

ERAD : Endoplasmic ReticulumAssociated Protein Degradation ; TCR : T cell receptor

En dehors de ces deux voies classiques de présentation des Ag, il existe une troisième voie : la présentation croisée, connue sous le terme de « cross-présentation ». Cette voie permet la présentation d'Ag exogènes *via* le CMH I, ou la présentation d'Ag cytoplasmiques générés par autophagie par le CMH II (Crotzer and Blum, 2010). La présentation croisée par le CMH I

joue un rôle important en permettant l'induction d'une réponse cytotoxique CD8⁺ antivirale contre les virus qui n'infectent pas directement les CPA. La présentation croisée par le CMH I permet également de générer une réponse antitumorale lorsque les Ag ne sont pas exprimés au sein des CPA (Joffre *et al.*, 2012). Toutes les DC ne sont pas capables d'effectuer une présentation croisée : les DDC Langérine⁺ ont cette capacité, contrairement aux LC. Après l'application cutanée d'un haptène, celui-ci est pris en charge par les DDC et les LC. Les DDC Langérine⁺ et Langérine⁻ capturent l'haptène, migrent jusqu'aux dLN, mais seules les DDC Langérine⁺ sont requises pour effectuer une présentation croisée aux LT CD8⁺ et participer ainsi à l'induction d'une réponse LT cytotoxique (L. Wang *et al.*, 2008).

2.3. Génération d'une réponse T spécifique de l'haptène

Après avoir capturé et endocyté l'haptène, acquis un phénotype mature et migré jusqu'aux ganglions drainants, les DC vont interagir avec les LT naïfs pour leur présenter l'haptène. Cette interaction est appelée synapse immunologique entre DC et LT.

2.3.1. La synapse immunologique, un dialogue de haute importance

L'activation des LT nécessite la combinaison de 3 signaux : le premier signal est constitué par l'interaction entre le TCR et le CMH, le deuxième signal par l'interaction des molécules de co-stimulation et le troisième signal par la sécrétion de cytokines par la DC, nécessaires à la différenciation des LT naïfs vers une réponse T helper (Th)1, Th2, Th9, Th17, ou Th22 (Figure 21).

2.3.1.1. L'interaction CMH/TCR

Le premier signal qui mène à l'activation des LT est constitué par l'interaction entre le CMH de la DC qui présente le complexe peptide-haptène modifié, et le TCR du LT. Il existe plusieurs types de reconnaissance de l'haptène : selon le modèle de l'haptène vrai, tel que la pénicilline, ou du pro-haptène, tel que la sulfaméthoxazole (SMX), ou alors selon le modèle « pharmacological interaction concept » (p-i concept) (Figure 22) (Posadas and Pichler, 2007).

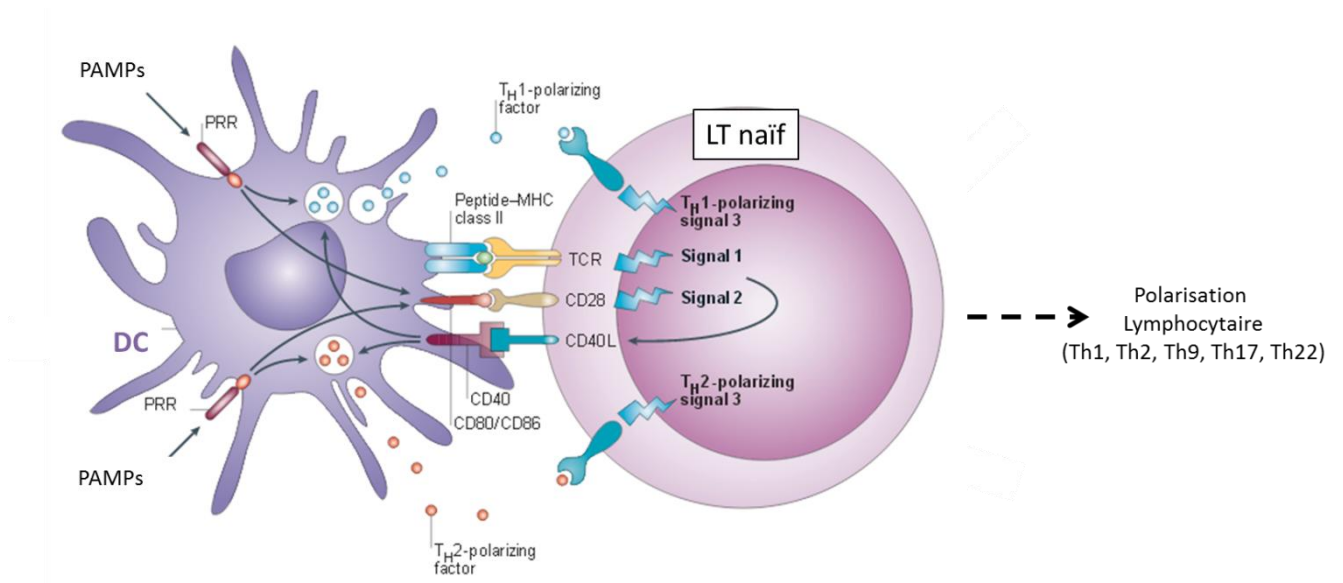


Figure 21. La synapse immunologique entre DC et LT
D'après Kapsenberg, 2003

- **Les haptènes**, tels que la pénicilline, peuvent lier les protéines solubles telles que l'albumine, les protéines membranaires telles que les intégrines, les protéines intracellulaires telles que les enzymes mais également les peptides du CMH lui-même (Adam *et al.*, 2011). Par conséquent, de nombreux déterminants antigéniques sont nouvellement formés par liaison de l'haptène avec différentes protéines, générant un large panel de réponses immunitaires (Figure 22a).

Afin d'être reconnu par les LT comme des Ag étrangers, les protéines hapténisées doivent être remaniées par les DC en peptides hapténisés présentés par les molécules du CMH I et du CMH II respectivement aux LT CD8⁺ et LT CD4⁺ naïfs (Adam *et al.*, 2011).

Les pro-haptènes tels que le SMX sont le plus souvent métabolisés au sein des cellules pour générer des molécules réactives (e.g. nitroso-SMX SMX-NO généré par le CYP2C9). Ces intermédiaires hautement réactifs vont fixer les protéines intracellulaires, créant des déterminants néo-antigéniques présentés aux LT (Posadas and Pichler, 2007). Il a cependant été montré que le SMX pouvait également interagir avec le TCR selon le **p-i concept** (Figure 22b).

- **Le p-i concept**, proposé il y a une quinzaine d'années par WJ Pichler, décrit que certaines molécules telles que le SMX ou l'abacavir, chimiquement inertes et

incapables de se lier de façon covalente aux protéines peuvent néanmoins activer des LT mémoires ou effecteurs. Certaines molécules telles que le SMX sont capables d'interagir directement avec le TCR des LT par des liaisons labiles et réversibles, conduisant à l'activation des LT indépendamment du CMH, bien que celui-ci soit requis pour une activation totale des LT (Figure 22b). De plus, des molécules telles que l'abacavir peuvent fixer certains déterminants du CMH I et par conséquent activer une forte réponse immunitaire CD8⁺ (Figure 22c) (Adam *et al.*, 2011). Certains allèles Human Leukocyte Antigen (HLA) conférant une prédisposition aux réactions immunitaires. Par exemple, l'allèle HLA-B*5701 est fortement associé aux réactions immunitaires contre l'abacavir (Mallal *et al.*, 2002). En effet, l'abacavir lie avec une haute affinité HLA-B*5701 stabilisant ainsi le complexe HLA-TCR en l'absence de peptide.

La reconnaissance des métaux peut toutefois être différente de celle des haptènes non métalliques. Similairement à la reconnaissance des haptènes vrais, les TCR spécifiques des métaux reconnaissent les déterminants formés par le complexe des ions métalliques avec des peptides du soi ancrés dans le CMH (Gamerding *et al.*, 2003). Certains TCR reconnaissent des complexes formés par le métal avec les acides aminés du CMH lui-même. Dans des cellules SE9 issues d'un clone de LT humains, le nickel interagit directement avec la Tyr29 et le Tyr94 de la chaîne α du TCR et le résidu conservé His81 de la chaîne β du CMH (Gamerding *et al.*, 2003). Ainsi, tout comme les superantigènes, le nickel effectue des liaisons directes avec le CMH et le TCR en l'absence de modification peptidique, mais contrairement aux superantigènes, le nickel nécessite la présence d'acides aminés spécifiques au sein du TCR (Gamerding *et al.*, 2003).

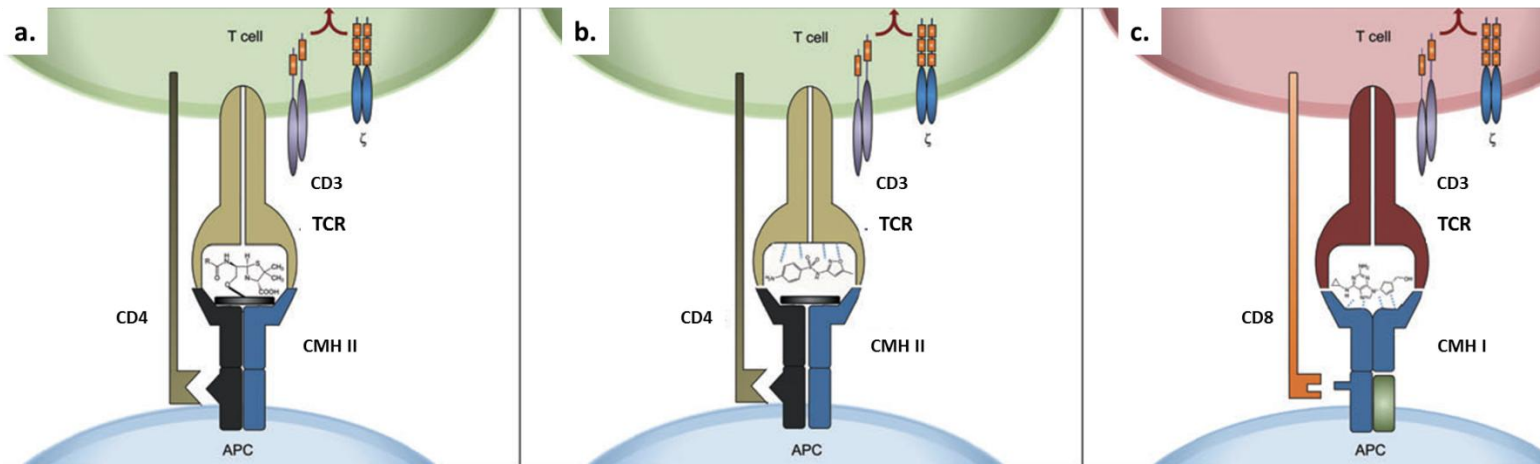


Figure 22. Reconnaissance des haptènes par les LT

(Adam *et al.*, 2011)

a. Modèle de l'haptène. La molécule, ici la pénicilline, est conjuguée à un peptide générant un nouveau déterminant antigénique présenté par le CMH II.

a. Pi concept et activation des LT CD4⁺. La molécule, ici le SMX, lie de façon non-covalente le TCR. L'interaction du CMH II avec le TCR est requise pour activer les LT.

c. Pi concept et activation des LT CD8⁺. La molécule, ici l'abacavir, lie de façon non covalente le déterminant HLA-B du CMH I, stabilisant le complexe HLA-TCR en l'absence de peptide.

2.3.1.2. Les molécules de co-stimulation et de co-inhibition

Les récepteurs de co-stimulation et de co-inhibition, regroupés sous le terme de récepteurs de co-signalisation, jouent un rôle crucial dans la réponse cellulaire T, car ils décident de l'issue fonctionnelle de l'activation des LT. La liaison de ces récepteurs constitue le signal 2 de la synapse immunologique. En effet, la seule interaction du TCR avec le CMH est insuffisante pour déclencher l'activation des LT (Mueller *et al.*, 1989). Les récepteurs de co-signalisation sont des molécules de surface qui transduisent le signal induit par l'activation TCR soit de manière positive (co-stimulation) soit de manière négative (co-inhibition). La grande majorité des récepteurs de co-signalisation appartient à la superfamille des immunoglobulines (IgSF), ou à la superfamille des récepteurs du TNF (TNFRSF) (Chen and Flies, 2013).

- **Les marqueurs de co-stimulation**

Un nombre limité de récepteurs de co-stimulation sont exprimés sur les LT naïfs et agissent de façon synergique avec la signalisation TCR/CD3 lors du priming des LT, ce qui suggère une régulation très fine de cette phase d'initiation (Figure 23). **CD28** est exprimé

constitutivement sur les LT et est requis pour le « priming » des LT naïfs. CD28 interagit avec les molécules de co-stimulation **CD80 (B7-1)** et **CD86 (B7-2)** exprimées sur les DC. La liaison entre CD28 et CD86 est indispensable au développement d'une HSC (Kondo *et al.*, 1996). L'interaction de CD80 et CD86 avec CD28 semblerait délivrer le signal de co-stimulation le plus fort car les LT déficients en CD28 ne prolifèrent pas en présence de CPA (Green *et al.*, 1994). L'activation de LT en l'absence de co-stimulation par le CD28 conduit à un état d'anergie caractérisé par une forte diminution de la production d'IL-2 et d'autres cytokines effectrices malgré la stimulation du TCR. Ainsi, les DC exprimant faiblement le CD80 et le CD86 induisent un état de tolérance (Bakdash *et al.*, 2013).

CD40 et **Ox40 (CD134)**, deux autres membres des TNFRSF jouent également un rôle important dans l'activation des LT. La liaison du **CD40**, marqueur d'activation de la DC, à son ligand **CD40L (ou CD154)**, amplifie le processus d'activation des LT en induisant une forte production de cytokines, tout particulièrement de l'IL-12, et l'induction d'autres molécules de co-stimulation comme Ox40 (deLuca and Gommerman, 2012). Le blocage de l'interaction CD40-CD40L par un anticorps monoclonal anti-CD40L inhibe la génération d'une réponse Th1 et entraîne la production de cytokines de la voie Th2 telles que l'IL-4 (Hancock *et al.*, 1998). De plus, les DC issues de souris déficientes pour *cd40* induit un état de tolérance *via* l'induction de Treg sécréteurs d'IL-10 (E. Martin *et al.*, 2003).

L'interaction d'**Ox40**, présent sur les LT naïfs et de son ligand **Ox40-L (CD252)**, à la surface des DC, renforce l'expression de CD80 et CD86 à la surface des DC (Chen *et al.*, 1999). Par ailleurs, des souris invalidées pour le gène *ox40l* développent une HSC et une prolifération lymphocytaire diminuées en réponse à l'oxazolone ou au DNFB (Chen *et al.*, 1999).

Le ligand Inducible T cell Co-Stimulator (**ICOS-L** ou **B7-H2**), participe à la co-stimulation des LT en interagissant à la fois avec **CD28**, mais aussi avec **ICOS** à la surface des LT (Chen and Flies, 2013). L'inhibition de l'interaction d'ICOS-ICOS-L par un anti-ICOS inhibe la réponse Th2 en réponse à l'antigène D10.G4, orientant spécifiquement une réponse Th2 (Coyle *et al.*, 2000). De plus, les LT exprimant ICOS *in vivo* produisent majoritairement les cytokines Th2 IL-4, IL-5 et IL-13 (Löhning *et al.*, 2003). Cependant, il a été montré que ICOS est également impliqué dans l'orientation d'une réponse Th17 et l'expression d'ICOS à la surface des LT est

associée à la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, suggérant un rôle d'ICOS dans l'induction d'une réponse tolérogène (Bakdash *et al.*, 2013).

Par ailleurs, bien que **CD27** soit constitutivement exprimé sur les LT naïfs et qu'il puisse promouvoir la prolifération lymphocytaire T en interagissant avec **CD70**, présent sur les DC, il est incapable de procéder à l'activation des LT en l'absence de CD28 (Denoeud and Moser, 2011). Une sous-population de DC murine induit la production d'IFN γ par les LT *via* CD70 et indépendamment de la sécrétion d'IL-12. De plus, l'interaction CD70-CD27 altère la polarisation Th17 (Bakdash *et al.*, 2013).

Le récepteur Herpes Virus Entry Mediator (**HVEM**) et son ligand **LIGHT (CD258)** sont tous deux exprimés à la fois sur les DC et sur les LT naïfs. L'interaction de ces deux récepteurs peut également permettre le « priming » des LT naïfs, l'expression d'HVEM est par la suite diminuée sur les LT activés (Bakdash *et al.*, 2013).

Le récepteur **4-1BB (CD137)** est exprimé sur LT suite à l'activation du TCR et lie **4-1BBL** à la surface des CPA activées. L'interaction 4-1BB/4-1BBL peut induire la production d'IL-2 indépendamment de CD28 après stimulation du TCR, et induit un signal de co-stimulation qui renforce l'activation des LT CD8⁺ (Shuford *et al.*, 1997). De plus, cette interaction augmente la production de cytokines Th1 au détriment des cytokines Th2.

Le récepteur Glucocorticoid-Induced TNFR related gene (**GITR**) est exprimé à la surface des LT activés et lie le GITR-Ligand (**GITRL**) à la surface des CPA. L'interaction GITR/GITRL induit un signal de co-stimulation qui renforce la prolifération et les fonctions effectrices des LT après une stimulation du TCR. Les Treg expriment constitutivement GITR, suggérant un rôle de ce récepteur dans l'induction d'une tolérance (Bakdash *et al.*, 2013).

Les récepteurs de la famille T cell Ig domain and Mucine domain (**TIM**) comprennent 3 membres chez l'Homme : TIM1, TIM3 et TIM4. TIM3 est un marqueur des Th1 (Monney *et al.*, 2002), mais peut également être exprimé sur les DC. La liaison de TIM3 à la galactine-9 induit la production de TNF α (Bakdash *et al.*, 2013). TIM4 est exclusivement exprimé par les DC et non sur les LT. TIM4 peut lier TIM1 à la surface des LT, induisant un signal co-

stimulateur qui promeut la l'expansion des LT et la production de cytokines pro-inflammatoires (Bakdash *et al.*, 2013).

Enfin, les molécules d'adhésion telles qu'**ICAM-1** et Lymphocyte Function associated Antigen-3 (**LFA-3**) sont exprimées par les DC et lient leurs ligands à la surface des LT **LFA-1** et **CD2** respectivement. Leur liaison stabilise l'interaction entre les DC et les LT et délivrent un signal co-stimulateur en renforçant la prolifération et à la différenciation des LT (Bakdash *et al.*, 2013).

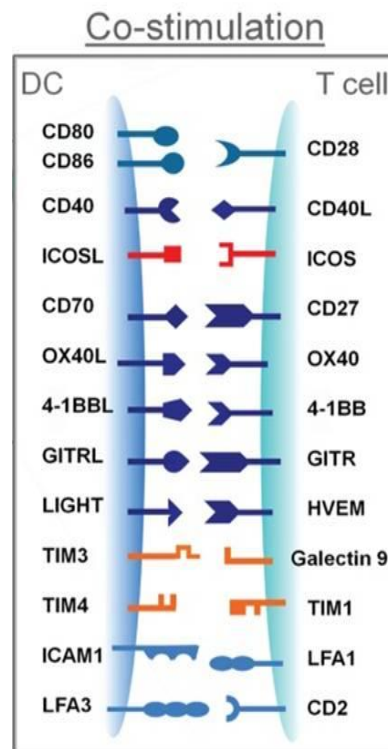


Figure 23. Les principales molécules de co-stimulation dans le priming des LT naïfs par les DC
D'après Bakdash *et al.*, 2013

- **Les marqueurs de co-inhibition**

Les molécules de co-inhibition délivrent un signal inhibiteur intracellulaire et contrôlent l'activation excessive des LT (Figure 24). Certains ligands peuvent s'avérer co-stimulateurs ou co-inhibiteurs suivant le récepteur qu'ils lient (Figure 24).

Lorsque C80 (B7-1) et CD86 (B7-2) lient CD28, ils délivrent un signal co-stimulateur. Ces deux ligands ont toutefois une affinité plus forte pour la molécule Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 (**CTLA4**) qui permet de délivrer un signal inhibiteur (Figure 20). Les fonctions

inhibitrices de CTLA4 sont importantes à la fois pour lutter contre l'auto-immunité spontanée, mais également en agissant comme frein dans l'activation des réponses T. Les souris déficientes pour le gène codant pour *ctla4* développent un syndrome lymphoprolifératif avec une infiltration de LT polyclonaux dans les organes qui est létale (Tivol *et al.*, 1995). La liaison de CTLA4 à CD80 et CD86 induit un état de tolérance cellulaire T périphérique (Greenwald *et al.*, 2001). Les Treg CD4⁺CD25⁺ expriment fortement CTLA4, suggérant que CTLA4 peut également induire l'activation de Treg participant ainsi à la génération d'un état de tolérance (Bakdash *et al.*, 2013). L'interaction CD80/86 avec CTLA4 induit le catabolisme du tryptophane en augmentant l'expression de l'Indoleamine 2,3-DiOxygenase (IDO) par les DC, ce qui conduit à l'inhibition de la réponse T en inhibant la prolifération des LT et/ou en induisant leur apoptose par les catabolites du tryptophane (Chen, 2004).

La protéine Programmed cell Death-1 (**PD-1 ou CD279**) est une autre molécule co-inhibitrice de la famille B7 (Figure 20). Les souris déficientes pour le gène *pd1* développent spontanément un syndrome lupique, une glomérulonéphrite et une cardiomyopathie autoimmune (Chen, 2004). Deux ligands de PD-1 sont connus à ce jour : PDL-1 (B7-H1) et PDL-2 (B7-DC), et plus récemment il a été décrit que PDL-1 et CD80 pouvaient interagir ensemble pour participer au maintien de la tolérance périphérique (Park *et al.*, 2010). La liaison de PDL-1 à PD-1 induit l'apoptose des LT effecteurs *in vitro* et *in vivo* (Dong *et al.*, 2002). Cependant, PDL-2 peut également lier CD28 et ICOS par compétition et délivrer un signal stimulateur (Chen, 2004). L'administration d'un anticorps monoclonal anti-PD-1 ou anti-PDL-1 augmente de manière significative et prolongée une HSC, tandis que l'administration d'un anti-PDL-2 n'a aucun effet (Tsushima *et al.*, 2003).

Enfin, la molécule co-inhibitrice B and T Lymphocyte Attenuator (**BTLA**), constitutivement exprimée sur un grand nombre de cellules (LB, LT naïfs, Ma, DC, NKT et NK) lie HVEM à la surface des CPA (Figure 20) (Bakdash *et al.*, 2013). Son expression est rapidement augmentée sur les LT CD4⁺ polarisés Th1 et Th2 mais elle n'est pas exprimée sur les Treg. BTLA est un régulateur négatif de la réponse immunitaire contre les auto- et allo-Ag. *In vivo*, les souris déficientes pour *btla* développent des pathologies auto-immunes (Watanabe *et al.*, 2003), et il a été mis en évidence *in vitro* que les LT CD8⁺ issus de souris déficientes pour *btla*

prolifèrent plus que les LT CD8⁺ issus de souris sauvages (Krieg *et al.*, 2007). D'autre part, ces mêmes souris déficientes pour *btla* ont une augmentation de la différenciation des LT CD8⁺ en LT CD8⁺ mémoires (Krieg *et al.*, 2007). HVEM, exprimé sur les DC et les LT peut lier BTLA, mais également CD160, qui fonctionne également comme un récepteur co-inhibiteur. Paradoxalement, une étude a mis en avant que BTLA et CD160 pourraient également fonctionner comme des ligands co-stimulateurs pour HVEM, promouvant l'activation de NF-κB et la survie cellulaire, participant ainsi à l'activation des LT (Cheung *et al.*, 2009).

B7-H3 appartient à la famille des molécules B7, et peut être exprimée à la surface des DC et des monocytes. B7-H3 se lie à un récepteur à la surface des LT encore inconnu à ce jour. Initialement, B7-H3 a été montré comme étant une molécule co-stimulatrice qui induit la prolifération des LT et la production d'IFNγ (Bakdash *et al.*, 2013). Ceci a été contredit par une autre étude, mettant en avant son rôle fortement inhibiteur dans la stimulation des LT. De plus, les souris invalidées pour *b7-h3* développent une inflammation des voies pulmonaires exacerbée en réponse à l'ovalbumine (Suh *et al.*, 2003). L'inhibition de B7-H3 par une protéine recombinante augmente la prolifération des LT *in vitro* en réponse à un anti-CD3, confirmant bien le rôle inhibiteur de B7-H3 (Suh *et al.*, 2003).

B7-H4 est le dernier membre de la famille des molécules B7 à avoir été identifié, bien que son ligand soit encore inconnu à ce jour. B7-H4 peut être exprimé sur les LT, les LB, les monocytes et les DC après stimulation et régule négativement l'activation des LT (Bakdash *et al.*, 2013). Le traitement de LT par une protéine de fusion B7-H4 entraîne l'inhibition de la prolifération des LT et de la production des cytokines en réponse à une stimulation par un anti-CD3 (Sica *et al.*, 2003).

Les récepteurs inhibiteurs **Ig-Like Transcript (ILT)-3 et ILT-4** sont exprimés par les monocytes, les macrophages et les DC. ILT-3 et ILT-4 délivrent tous les deux un signal inhibiteur. Tandis que le ligand d'ILT-3 n'est pas encore connu, il a été montré qu'ILT-4 peut interagir avec le CMH I (Bakdash *et al.*, 2013). De plus, les MoDC immatures traitées par de l'IL-10 expriment ILT-3 et ILT-4, leur conférant un état tolérogène. Ces DC ont la capacité de convertir des LT effecteurs en Treg (Gregori *et al.*, 2010).

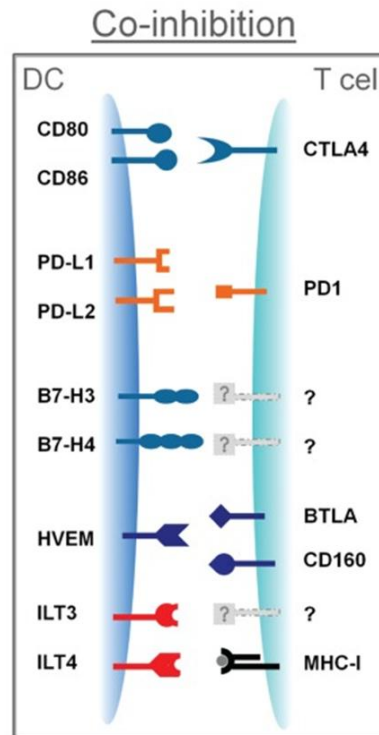


Figure 24. Molécules co-inhibitrices de la famille CD28-B7
(Bakdash *et al.*, 2013)

2.3.1.3. La sécrétion de cytokines par la DC oriente la polarisation lymphocytaire

La différenciation des LT naïfs en LT helper et effecteurs est dépendante de la présence de cytokines secrétées au cours de l'interaction entre les DC et les LT. La sécrétion de cytokines par la DC constitue le signal 3 de la synapse immunologique, et en l'absence de celui-ci, il n'y a pas de polarisation lymphocytaire T malgré le phénotype mature des DC (Jiang *et al.*, 2007). Après avoir endocyté un haptène et migré jusqu'aux ganglions drainants, la DC va activer des LT CD4⁺ et LT CD8⁺ spécifiques de cet haptène (Vocanson *et al.*, 2009).

Suivant l'état d'activation des DC et les cytokines présentes dans le microenvironnement, un LT CD4⁺ naïf peut se différencier en LT helper (Th) Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 ou en T follicular helper T_{FH}, qui sécréteront à leur tour des cytokines spécifiques (Akdis *et al.*, 2012). L'ensemble des cytokines générant ces populations, leurs rôles ainsi que les cytokines secrétées est résumé dans la figure 25. La polarisation lymphocytaire de type 1 (Th1) est cruciale pour le développement de LT effecteurs spécifiques et une réaction d'HSC optimale.

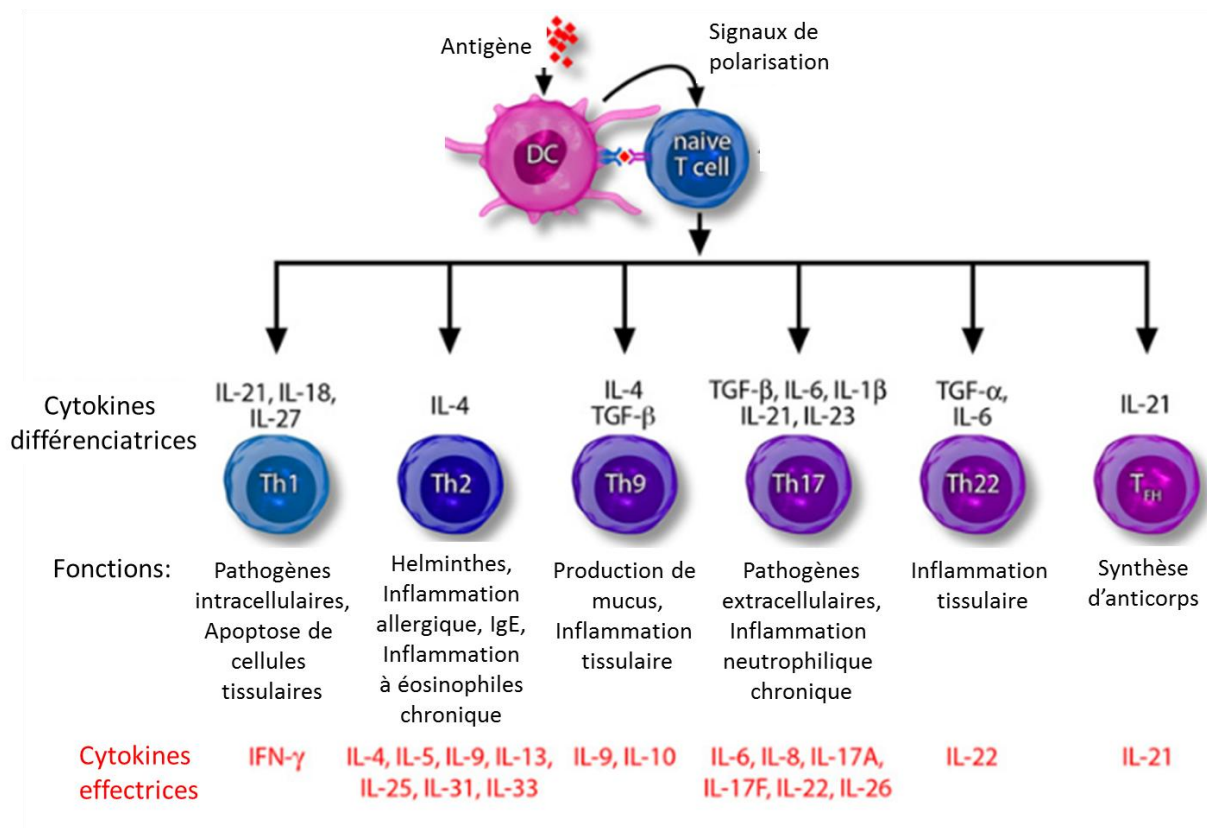


Figure 25. Les différentes sous-populations de LT
D'après Akdis *et al.*, 2012

Tout comme les LT CD4⁺, les LT CD8⁺ peuvent être orientés selon la nature des cytokines présentes vers une polarisation Tc1 associée à une production d'IFN γ , ou une polarisation Tc2, associée à la production d'IL-4 et d'IL-10 (Croft *et al.*, 1994).

La quasi-totalité des haptènes testés dans les modèles expérimentaux ont mis en évidence que la réponse inflammatoire cutanée est médiée par des cellules CD8⁺ Tc1 (Vocanson *et al.*, 2009). L'injection d'IL-12 pour induire une polarisation de type 1 au moment de la sensibilisation favorise la différenciation de LT CD8⁺ et augmente la réaction d'HSC (Gorbachev *et al.*, 2001). En revanche, l'utilisation d'IL-4 ou d'un anticorps monoclonal anti-IFN γ pour polariser une réponse LT de type 2 altère le priming des LT CD8⁺ et diminue la réaction d'HSC (Gorbachev *et al.*, 2001).

2.3.2. Génération des lymphocytes T spécifiques de l'haptène

2.3.2.1. Génération de LT effecteurs

La phase de sensibilisation de l'eczéma allergique de contact s'achève par la génération de LT effecteurs et mémoires. L'activation des LT varie selon la nature de l'antigène. Certaines molécules allergisantes, telles que les allergisants respiratoires comme les anhydrides phthalique ou triméllitique vont induire une réponse Th2. D'autres molécules allergisantes telles que les allergènes cutanés comme le DNCB, le DNFB ou l'oxazolone favoriseront une réponse Th1/Tc1 (Gorbachev and Fairchild, 2001; Martin and Jakob, 2008). Certains allergènes peuvent également induire une voie Th17. Ainsi le NiSO₄ induit une réponse Th1/Tc1 et Th17/Tc17 (Vocanson *et al.*, 2009). L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans l'infiltration des leucocytes dans les tissus inflammatoires, mais également impliquée dans la production de diverses cytokines et chimiokines comme MCP-1, MIP-1 β et l'IL-10 (He *et al.*, 2009). Les souris invalidées pour le gène codant pour l'*il-17* ou pour l'*ifn γ* ne développent pas d'HSC en réponse au DNFB et l'infiltrat de cellules inflammatoires (PN, LT CD8⁺) au niveau cutané est diminué (Kish *et al.*, 2009).

Les sous-populations Th1, Th2 et Th17 sont caractérisées par les cytokines qu'elles produisent mais également par l'expression de facteurs de transcription différents (Figure 26). Ainsi, les Th1 expriment le facteur T Box Transcription (TBX21 ou t-bet) ainsi que la protéine Signal Transducer and Activator of Transcription-4 (STAT4) et secrètent tout particulièrement de l'IFN γ mais aussi du TNF α et de l'IL-2. La sous-population Th2 est caractérisée par l'expression de STAT6 et GATA3, et la sécrétion d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13. Enfin, les Th17 expriment STAT3 et RAR-Related Orphan Receptor α ou γ T (ROR α/γ T) et produisent principalement de l'IL-17 (Lahoute *et al.*, 2011). Enfin, les DC immatures ou semi-matures sont tolérogènes et vont favoriser la différenciation des LT en Treg, décrits dans la partie II.4.2.

Les cytokines générées par une sous-population spécifique peuvent diminuer l'émergence d'un autre type de sous-population, comme indiqué dans la figure 26.

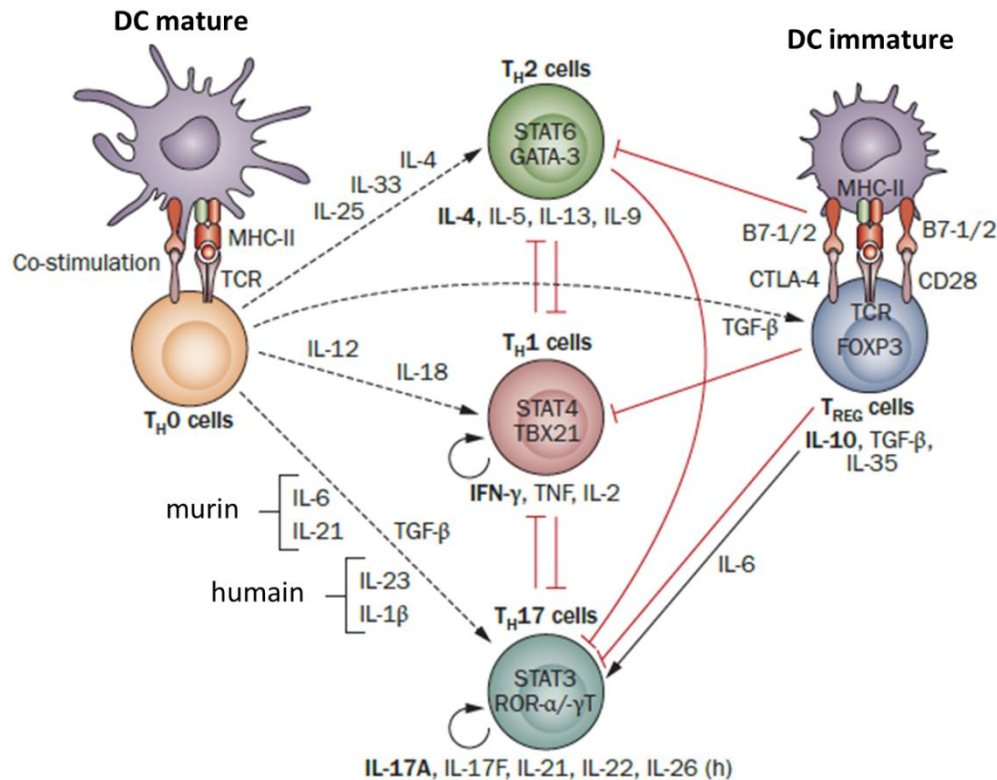


Figure 26. Différenciation, activation et interactions entre les différentes sous-populations de LT

(Lahoute *et al.*, 2011)

Les DC immatures activent les LT naïfs (T_H0) en T reg, tandis qu'une DC mature va différencier les T_H0 en Th1, Th2 ou Th17 suivant les cytokines qu'elle sécrètera.

TBX21, T-box transcription factor TBX21 (T-bet); STAT: signal transducer and activator of transcription; RORα/γT: RAR-related Orphan Receptor α ou γT; TCR, T-cell receptor; TGFβ1, transforming growth factor β1; TH, T-helper cell; TNF, tumor necrosis factor; TREG, T-regulatory cell.

Plus récemment, une nouvelle sous-population de LT a été identifiée comme étant impliquée dans l'HSC : les cellules Th9. Ces cellules sont attirées dans la peau où y sont résidentes, et produisent principalement de l'IL-9, aux propriétés à la fois pro- et anti-inflammatoires (Eyerich and Zielinski, 2014). L'inhibition d'IL-9 augmente la production d'IFNγ *in vitro*. En effet, l'inactivation du gène de l'*il-9* chez des souris entraîne le développement d'une HSC majorée en réponse au DNFB et des niveaux élevés d'IFNγ dans la peau des oreilles par rapport aux souris sauvages (J. Liu *et al.*, 2014).

Dans les années 1980, Cher et Mosmann ont établi un rôle crucial des LT CD4⁺ dans les réactions d'hypersensibilité retardée (HSR) (Cher and Mosmann, 1987). Cependant, il a plus récemment été mis en évidence que chez la souris, l'HSC en réponse à des haptènes est

médiée par des LT CD8⁺ et régulée par des LT CD4⁺ (Vocanson *et al.*, 2009). Plusieurs modèles ont montré qu'il est possible de générer des LT CD8⁺ effecteurs en l'absence de cellules CD4⁺. En effet, (1) des souris déplétées en LT CD8⁺ ne peuvent pas développer d'HSC (Gocinski and Tigelaar, 1990), (2) des souris déplétées ou déficientes en LT CD4⁺ développent une HSC majorée (Gocinski and Tigelaar, 1990) et (3) des DC issues de souris déficientes pour le gène du *cmh I* ne peuvent induire de sensibilisation lorsqu'elles sont transférées à des souris WT, contrairement à des DC issues de souris déficientes pour le gène du *cmh II*, qui induisent une réaction d'HSC normale (Bouloc *et al.*, 1998; Bour *et al.*, 1995; Kolesaric *et al.*, 1997). Les molécules allergisantes de contact ont deux propriétés qui peuvent expliquer leur immunogénicité en absence de LT CD4⁺. Tout d'abord, elles ont la capacité d'induire la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires par les cellules cutanées (Vocanson *et al.*, 2009). D'autre part, les liaisons covalentes des haptènes comme le DNFB ou le TNCB sur les acides aminés des protéines génèrent un grand nombre de peptides hapténisés qui activent de nombreux précurseurs de LT cytotoxiques (S. Martin *et al.*, 2003). Ainsi, la sensibilisation de souris par le TNCB génère des Ag TNP se fixant sur les protéines et générant de nombreux peptides hapténisés. Ceux-ci vont être présentés par les DC à un grand nombre de T_{EFF}. Une seule application de TNCB à des souris C57BL/6 induit dès 36h l'activation de LT CD8⁺ spécifiques du TNP dans les organes lymphoïdes secondaires (S. Martin *et al.*, 2003). Une fréquence élevée, comprise entre 0,1 et 0,2%, de LT CD8⁺ spécifiques du TNP est retrouvée dans les dLN après sensibilisation, ce qui explique la réponse rapide lors de l'élicitation (S. Martin *et al.*, 2003). Tandis que les LT CD8⁺ sont les cellules effectrices de l'EAC chez les souris sauvages en réponse au TNCB, les LT CD4⁺ peuvent provoquer une inflammation cutanée chez les souris déficientes en LT CD8⁺ (Martin *et al.*, 2004)

Bien que le rôle des LT CD8⁺ dans la physiopathologie de l'EAC soit indiscutable, les LT CD4⁺ sont également impliqués. Des LT CD4⁺ spécifiques de l'haptène majorant l'effet des LT CD8⁺ et participent ainsi à l'inflammation. Tout comme les LT CD8⁺, les LT CD4⁺ produisent de l'IFN γ , entraînant l'expression du CMH II à la surface des KC. Ceci permet l'interaction des LT CD4⁺ avec les KC induisant l'apoptose de ces derniers. La mort des KC amplifie les dommages tissulaires lors des réactions d'HSC (Traidl *et al.*, 2000). De plus, les LT CD4⁺ peuvent être les médiateurs de l'HSC en réponse à des haptènes forts chez la souris.

2.3.2.2. Génération de LT mémoires

Il suffit d'une brève stimulation antigénique (environ 24h) pour entraîner la différenciation de LT naïfs en LT effecteurs. Cependant, 2 à 4 jours d'exposition sont nécessaires pour permettre une expansion clonale optimale et la génération de T mémoires. En cas d'exposition prolongée (supérieure à 14 jours environ), les LT CD8⁺ effecteurs seront épuisés par la présence continue de l'antigène et de l'inflammation et leur différenciation en LT mémoires compétents sera affectée (Figure 27) (Arens and Schoenberger, 2010).

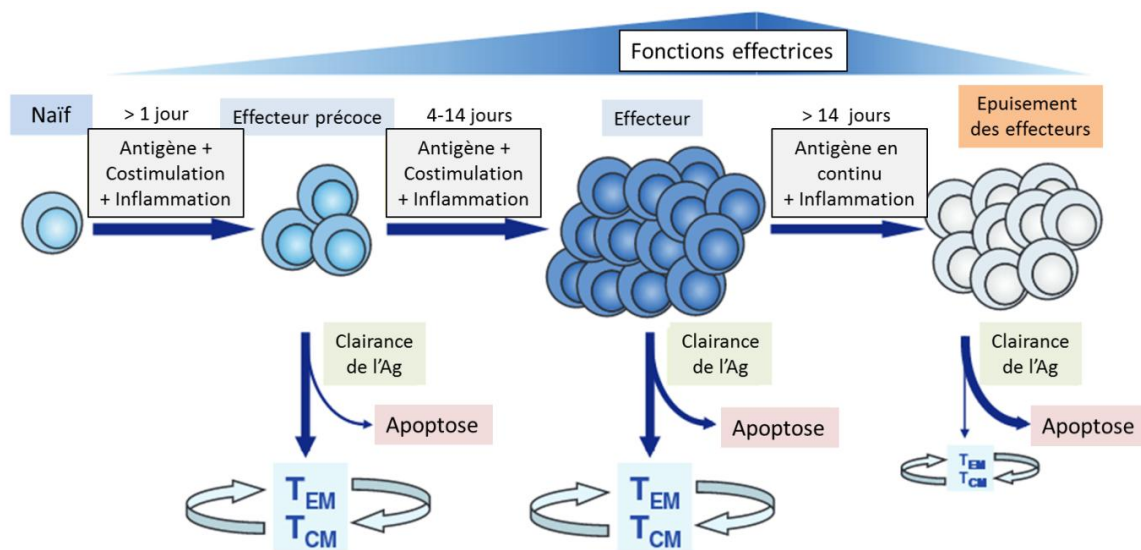


Figure 27. Expansion et différenciation des LT CD8⁺ en LT effecteurs et mémoires après l'interaction avec des DC activées par un antigène

(Arens and Schoenberger, 2010)

T_{EM} : T effecteurs mémoires ; T_{CM} : T centraux mémoires

Une fois activés, les LT émigrent du dLN par les vaisseaux lymphatiques efférents et rejoignent la circulation générale. L'émigration des LT hors du dLN est associée à des modifications de l'expression des récepteurs et des chimiokines. Différentes sous-populations de LT sont générées au cours d'une réponse immunitaire. Deux sous-populations de LT activés spécifiques diminuent l'expression de CCR7 perdant ainsi leur capacité de re-circuler dans les dLN. Ces sous-populations CCR7⁻ comprennent les T_{EFF} et les T_{EM}, capables de gagner les tissus périphériques et tout particulièrement la peau. Les LT CCR7⁺ constituent l'autre sous-population de LT mémoires, et sont appelés LT centraux mémoires (T_{CM}). Ils conservent leur capacité à re-circuler depuis le sang jusqu'aux dLN mais ne peuvent être recrutés dans les tissus (Sallusto *et al.*, 1999). En cas d'un contact ultérieur

avec l'haptène, les T_{EM} spécifiques peuvent agir comme des cellules de l'immunité innée en libérant rapidement de grandes quantités d'IFN γ et de CCL-5, augmentant l'efficacité de la réponse lymphocytaire T (Walzer *et al.*, 2003).

Les T_{EFF} et T_{EM} murins retrouvés dans la peau expriment les récepteurs aux chimiokines CCR4 et/ou CCR10, $\alpha 4\beta 1$ intégrine et CLA, qui sont cruciaux pour l'efficacité du homing des LT dans la peau (Santamaria-Babí, 2004). Le homing cutané des LT activés dépend du microenvironnement tissulaire et plus particulièrement des DC cutanées (Dudda *et al.*, 2004; Mora and von Andrian, 2006). La migration des LT du sang à la peau a lieu au niveau des veinules post-capillaires *via* les interactions de CLA et CCR4 avec leurs ligands, E-ou P-sélectine et CCL17 respectivement, constitutivement exprimés sur les cellules endothéliales (Berg *et al.*, 1991; Campbell *et al.*, 1999; Erdmann *et al.*, 2002). Le passage des LT dans le derme requiert l'interaction séquentielle des récepteurs VLA-4 et LFA-1 sur les LT avec les protéines Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) et Intracellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) sur les cellules endothéliales (Santamaria *et al.*, 1995).

Ainsi, à la fin de la phase afférente, les LT spécifiques activés par les DC présentant l'haptène sont trouvés dans les dLN (T_{CM}), dans le sang et dans la peau (T_{EFF} périphériques et T_{EM}). La peau conserve une apparence normale. Des LT spécifiques seront activés directement dans la peau et massivement recrutés lors d'un contact cutané ultérieur avec le même haptène : il s'agira de la phase d'élicitation ou phase afférente.

2.4. Rôle des Lymphocytes B

Les LT follicular helper (Tfh) sont différenciés à partir de LT CD4⁺ naïfs et se trouvent dans les organes lymphoïdes secondaires. Les Tfh spécifiques d'un Ag expriment CXCR5, ce qui leur permet de se localiser dans les centres germinatifs (Zone B) des organes lymphoïdes secondaires. Ils vont de ce fait pouvoir interagir avec les Lymphocytes B (LB), entraînant l'expansion et la différenciation de ces derniers en plasmocytes, producteurs d'anticorps (Tangye *et al.*, 2013). La réponse lymphocytaire B se déroule en deux phases : une phase précoce qui débute avec l'interaction entre les LB qui ont capturé l'Ag présenté par les Ma, et les LT spécifiques de l'Ag. Cette phase ayant lieu dans le manteau de la zone folliculaire (MZF), à la limite de la zone B avec la zone T, est rapide et génère des plasmocytes à courte

durée de vie qui vont produire des anticorps IgM de faible affinité pour l'Ag (Phan *et al.*, 2009). Par la suite, les DC folliculaires présentent l'Ag aux Tfh dans les centres germinatifs des follicules B, induisant la prolifération des LB, leur commutation isotypique et la différenciation en plasmocytes à forte affinité à longue demi-vie qui vont participer à la mise en place de la mémoire immunitaire (Allen *et al.*, 2007).

Il existe deux sous-populations de LB: les LB-1 et les LB-2. Les LB-1 situés dans la cavité péritonéale sont activés dans l'heure qui suit le contact avec une molécule allergisante et migrent dans la rate et les dLN, où ils vont produire des IgM anti-molécule allergisante (Itakura *et al.*, 2005). Il a été montré que la sensibilisation de souris avec la protéine Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) entraîne l'activation des LB-1 qui produisent des anticorps immunoglobulines M (IgM) anti-KLH. Lors d'un nouveau contact avec la KLH, les IgM forment un complexe avec la molécule allergisante et activent le complément C5a qui va stimuler les mastocytes. Ces mastocytes vont libérer des médiateurs vasoactifs, entraînant une activation de l'endothélium et le recrutement de T_{EFF} (Szczepanik *et al.*, 2003).

Les LB-2, quant à eux, peuvent migrer vers les organes lymphoïdes et sont dépendants des LT pour produire différentes classes d'anticorps : IgG1, IgG2, IgGE (Askenase *et al.*, 2004).

Ainsi, la peau est le siège d'un vaste réseau cellulaire très organisé qui veille à l'intégrité de la structure cutanée. Cette défense efficace est possible car ces cellules ont la capacité d'identifier un danger et de mettre en œuvre un système de défense afin de tenter de l'éliminer.

3. Physiopathologie de l'eczéma allergique de contact : la phase d'éllicitation

Certains individus préalablement sensibilisés à un haptène et réexposés au même haptène vont développer une réaction inflammatoire cutanée : il s'agit de la phase d'éllicitation de l'EAC, cliniquement apparente. Cette phase d'éllicitation, ou phase efférente, se déroule en trois étapes : (1) le recrutement précoce des LT CD8⁺ effecteurs activés au cours de la sensibilisation environ 2h après réexposition à l'haptène, *via* l'activation de l'endothélium suite à l'inflammation cutanée induite par l'haptène, (2) la production subséquente de cytokines/chimiokines conduit à l'activation des cellules résidentes de la peau, engendrant la libération de nouveaux médiateurs de la réaction inflammatoire, (3) le recrutement des

leucocytes, et tout particulièrement des neutrophiles, des macrophages et des LT, qui induisent progressivement les changements cliniques et morphologiques caractéristiques de l'EAC (Vocanson *et al.*, 2009).

3.1. Le recrutement précoce des T_{EFF}

Le recrutement des T_{EFF} est initié dans le foie durant la phase de sensibilisation par l'activation de NKT invariants (iNKT) producteurs d'IL-4, dans les heures qui suivent le contact de l'haptène avec la peau. Les iNKT vont entraîner la migration de sous-populations de LB, B1-like, jusqu'aux organes lymphoïdes et par conséquent la production d'anticorps IgM spécifiques de l'haptène dès 24h post-sensibilisation (Campos *et al.*, 2006). En cas de réexposition, les IgM spécifiques vont lier l'haptène, formant un complexe qui va activer le complément et générer du C5a (Tsuji *et al.*, 2000). Le C5a va stimuler les mastocytes environnants et les plaquettes *via* leurs récepteurs au C5a, entraînant la libération de la sérotonine vasoactive et de TNF α (Askenase *et al.*, 1980; Tamagawa-Mineoka *et al.*, 2007). Ceci va entraîner une activation vasculaire locale et le recrutement de T_{EFF} spécifiques préalablement stimulés par l'haptène lors de la phase de sensibilisation, environ 2h après la réexposition.

En réponse au nickel, les LT CD8⁺ activés vont sécréter de l'IFN γ et du TNF α , puissants activateurs des kératinocytes. Ces deux cytokines vont induire l'expression d'ICAM-1 et du CMH II à la surface des KC, ainsi que la libération de CXCL-9, CXCL-10 et CXCL-11 (Albanesi *et al.*, 2001, 1999). En plus des LT producteurs d'IFN γ , un certain nombre de LT producteurs d'IL-17 ont été identifiés chez des patients allergiques au nickel (Albanesi *et al.*, 2000). L'IL-17 augmente de façon spécifique et dose-dépendante l'expression d'ICAM-1 à la surface des KC ainsi que la sécrétion d'IL-8 en réponse à l'IFN γ et au TNF α (Albanesi *et al.*, 1999). L'IL-17 agit ainsi en synergie avec l'IFN γ et le TNF α pour activer les KC. Ceci a été confirmé par des études *in vivo* : les souris invalidées pour le gène de *il-17* présentent un défaut d'activation des LT spécifiques du TNCB et développent par conséquent une HSC au TNCB significativement réduite par rapport aux souris sauvages (Nakae *et al.*, 2002). De plus, la neutralisation de l'IL-17 par un anticorps monoclonal supprime la phase d'éllicitation en réponse au DNFB chez la souris (He *et al.*, 2006). Il a par ailleurs été montré une diminution

significative de la réponse allergique chez des souris déficientes en IFN γ ou aux récepteurs à l'IFN γ (Wakabayashi *et al.*, 2005).

Bien que le rôle délétère des cytokines soit indiscutable, c'est le caractère cytotoxique des LT CD8⁺ qui conduit au développement d'une HSC. Les LT CD8⁺ vont être différenciés en LT cytotoxiques (CTL) libérant de la perforine, protéine cytolytique qui va former des pores dans les cellules cibles, ainsi que des granzymes, sérine-protéases qui rentrent par les pores générés par la perforine, entraînant ainsi l'apoptose des cellules cibles. L'interaction de Fas, sur la cellule cible, et de Fas-ligand (Fas-L), appartenant à la famille du TNF, présent sur le CTL, va également mener à l'apoptose de la cellule cible. La lyse des cellules par les CTL ainsi que la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ et le TNF α sont responsables des dommages tissulaires cutanés. Parallèlement, les LT CD4⁺ sont différenciés en cellules Th1 et vont également produire de l'IFN γ , du TNF α ainsi que de l'IL-2 (Kaeck and Cui, 2012).

Les souris doubles déficientes pour la *perforine* et *fas-L* sont incapables de développer une HSC au DNFB malgré la présence de LT CD8⁺ producteurs d'IFN γ sur le site de contact de l'haptène (Kehren *et al.*, 1999). Les KC sont les cibles principales de la cytotoxicité des LT CD8⁺. En effet, l'apoptose des KC est concomitante avec l'arrivée des LT CD8⁺ dans l'épiderme, et augmente proportionnellement avec le nombre de LT CD8⁺ infiltrés (Akiba *et al.*, 2002).

3.2. Rôle des chimiokines et cytokines dans le recrutement des T_{EFF}

Le recrutement de T_{EFF} dans la peau est orchestré par une libération séquentielle et coordonnée de chimiokines par les cellules cutanées résidentes ou nouvellement recrutées. L'haptène induit une inflammation locale *via* la libération de TNF α et d'IL-1 β par les kératinocytes. Ces signaux inflammatoires entraînent l'extravasation des T_{EFF} du sang vers la peau en augmentant l'expression de VCAM-1/ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales et des E-/P-sélectines à la surface des T_{EFF} (Vocanson *et al.*, 2009). Des études d'hybridation *in situ* sur des biopsies de peau de patients atteints d'EAC à des allergènes variés tels que le NiSO₄ et la para-phénylènediamine (PPD) ont mis en évidence que les kératinocytes de la couche basale produisent de nombreuses chimiokines. Ainsi, CCL2, ou Monocyte-

Chemotactic Protein (MCP-1), est détecté 6h après réexposition à l'haptène NiSO_4 ou pPD et précède l'infiltrat de monocytes et de LT (Goebeler *et al.*, 2001). De plus, des biopsies cutanées de patients allergiques au nickel ont révélé que CCL27 est fortement produit par les kératinocytes de la couche basale après une exposition au nickel, attirant les LT CLA^+ exprimant CXCR10, récepteur de CCL27 (Homey *et al.*, 2002). De plus, une étude menée chez des patients allergiques au nickel, au cobalt ou aux fragrances a montré que les LT recrutés sur le site inflammatoire durant la phase précoce d'élicitation sont principalement des Th1 qui sécrètent de l' $\text{IFN}\gamma$ mais également des Th17 qui sécrètent de l'IL-17, de l'IL-22 et du $\text{TNF}\alpha$ (Pennino *et al.*, 2010). L' $\text{IFN}\gamma$ produit par les T_{EFF} renforce l'expression d'ICAM-1 et du CMH II à la surface des kératinocytes, en faisant ainsi des cibles privilégiées de la cytotoxicité des LT CD8^+ (Traidl *et al.*, 2000). S'ensuit dès lors une phase d'amplification de l'EAC : les kératinocytes produisent abondamment CXCL9, CXCL10 et CXCL11 environ 12h après l'application d'haptènes tels que le nickel ou la pPD sur une peau sensibilisée et atteint un pic 72h après, parallèlement à l'infiltration lymphocytaire (Goebeler *et al.*, 2001). Ces chimiokines (CXCL9, CXCL10 et CXCL11) se lient sur leur récepteur CXCR3, exprimé sur 70% des LT infiltrés (Albanesi, 2010). Les kératinocytes produisent également les chimiokines CCL27, CCL5, CCL22 et CCL1. Les chimiokines CCL22 et CCL1 sont produites de manière plus faible et plus tardive, 24h à 96h après l'exposition à l'haptène (Albanesi *et al.*, 2001).

Cette production complexe de cytokines et chimiokines génère et amplifie la réponse inflammatoire initiée par l'exposition à l'haptène. Par ailleurs, elle est responsable d'une seconde vague d'infiltration leucocytaire.

3.3. L'amplification de l'inflammation

Les cellules recrutées comprennent les polynucléaires neutrophiles, les LT (70% des LT infiltrés sont CXCR3^+) et des monocytes inflammatoires capables de se différencier en macrophages et en DC.

Les lésions cutanées inflammatoires présentes dans l'EAC ou dans le psoriasis sont caractérisées par un recrutement tardif et massif des neutrophiles. L'intensité de l'infiltration neutrophilique est corrélée avec le nombre de LT CD8^+ activés par l'Ag recrutés au niveau du site cutané réexposé à l'Ag. De ce fait, l'EAC est réduit en l'absence de

polynucléaires neutrophiles : les souris déficientes en PN par délétion conditionnelle de *mcl1* ne développent pas d'HSC en réponse au TNCB (Weber *et al.*, 2014). La déplétion des PN par l'injection d'un anticorps anti-Ly6G, 24h avant l'élicitation avec du TNCB, inhibe la réaction allergique (Weber *et al.*, 2014). Les mastocytes produisent du $\text{TNF}\alpha$ et de l'IL-8, et recruteraient ainsi les neutrophiles exprimant constitutivement CXCR1 et CXCR2 (Biedermann *et al.*, 2000). Bien qu'il soit désormais établi que les mastocytes jouent un rôle primordial dans la physiopathologie de l'EAC, les mécanismes par lesquels ils sont activés et interagissent avec les LT sont encore à ce jour méconnus.

4. La régulation de l'eczéma allergique de contact

Initialement, la régulation de l'EAC fut attribuée à l'élimination rapide (quelques jours) de l'haptène dans la peau. Cependant, des études plus récentes ont mis en évidence que certains haptènes expérimentaux tels que l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), haptène dérivé de la fluorescéine réagissant avec les groupements nucléophiles des protéines, étaient capables de rester plus de deux semaines dans l'épiderme après une application cutanée unique (Saint-Mezard *et al.*, 2003).

La régulation de l'EAC peut être divisée en deux phases : une phase centrale et une phase périphérique (Gorbachev and Fairchild, 2001). La phase de régulation centrale contrôle l'expansion et la différenciation des LT CD8^+ effecteurs dans les dLN, tandis que la phase de régulation périphérique limite le processus inflammatoire au niveau cutané.

4.1. Régulation par l'environnement cutané

Dans les heures qui suivent l'exposition cutanée à un haptène et la libération d'interleukines pro-inflammatoires induite par l'haptène, les kératinocytes produisent des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et le $\text{TGF}\beta$ (Cavani *et al.*, 2007). L'IL-10 inhibe la production de médiateurs inflammatoires ($\text{IFN}\gamma$, IL-6, IL-1, $\text{TNF}\alpha$), la modulation de la maturation des DC et par conséquent l'activation des LT effecteurs (O'Garra and Vieira, 2004). Il a été montré que les mastocytes représentent une source importante d'IL-10, permettant ainsi de réguler le nombre de leucocytes sur le site de contact avec l'haptène et donc de réguler l'inflammation (Grimbaldeston *et al.*, 2007). Les grandes quantités d' $\text{IFN}\gamma$

libérées durant l'inflammation augmentent l'expression du CMH II à la surface des KC, ce qui stimule leur capacité de présentation de l'haptène. L'absence de signaux de co-stimulation peut néanmoins conduire à l'anergie ou à la mort de LT dont les TCR sont déjà engagés (Cavani *et al.*, 2003b). D'autre part, il a été mis en évidence que les cellules endothéliales diminuent l'expression de E- et P-sélectine à leur surface en présence d'IFN γ , ce qui limite l'arrivée de leucocytes nouvellement infiltrés dans le derme (Melrose *et al.*, 1998).

Cependant, bien que ces divers mécanismes soient importants dans la régulation de l'inflammation, il a été démontré que la régulation de l'EAC est principalement médiée par une sous-population de LT CD4⁺ suppresseurs/régulateurs (Xu *et al.*, 1996). Ce sont ces cellules qui régulent progressivement la réponse inflammatoire (Grimbaldeston *et al.*, 2007).

4.2. Les cellules T régulatrices conventionnelles

De plus en plus d'évidences indiquent que les pathologies cutanées inflammatoires et/ou allergiques telles que le psoriasis, l'EAC et la dermatite atopique sont le résultat d'une déficience des mécanismes régulateurs. Les LT CD4⁺ CD25⁺ sont des acteurs particulièrement importants dans le maintien de la tolérance et dans la régulation de l'HSC en réponse aux haptènes chez la souris et l'Homme (Cavani *et al.*, 2003a; Dubois *et al.*, 2003).

4.2.1. Les LT régulateurs CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺

Les LT CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ représentent 5 à 10% des LT CD4⁺ chez l'Homme et la souris. Ils sont impliqués tant dans la tolérance aux auto-Ag que dans le contrôle des réponses immunitaires contre les pathogènes, les alloAg et les allergènes (Sakaguchi *et al.*, 2006). Ces LT sont divisés en deux familles : les Treg naturels (nTreg) se développant dans le thymus, et les Treg inductibles iTreg, différenciés à partir de LT naïfs en présence de TGF β se développant en périphérie.

Une étude réalisée sur des souris transgéniques FoxP3 exprimant les protéines chimériques CD2 et CD52 humaines a mis en avant l'existence de LT CD4⁺ FoxP3⁺ mémoires et naïfs à l'état basal au niveau cutané. Au cours d'une réaction d'HSC, ces Treg migrent jusqu'aux dLN puis regagnent la peau pour y réguler localement l'inflammation (Tomura *et al.*, 2010).

Les LT CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ sont décrits comme étant la première ligne de contrôle de l'EAC. En effet, la déplétion *in vivo* de ces cellules chez la souris par un traitement avec un mAb anti-

CD25, au moment de la sensibilisation avec du DNFB, conduit à une augmentation de l'activation des LT CD8⁺ et une augmentation de la réaction d'HSC (Kish *et al.*, 2005). L'IL-2, sécrétée essentiellement par les LT CD8⁺ spécifiques de l'haptène dans les dLN durant la phase de sensibilisation, serait requise pour la régulation des T_{EFF} par les LT CD4⁺ CD25⁺ (Kish *et al.*, 2005). Le traitement de souris par de l'IL-2 conduit à une diminution de la réaction d'HSC en réponse au DNFB et une augmentation de la population de LT CD4⁺ CD25⁺ (Rückert *et al.*, 2002).

Il semblerait que les Treg CD4⁺ CD25⁺ suppriment la réaction d'HSC en bloquant l'influx de T_{EFF} dans les tissus inflammés (Ring *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'injection de Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 2h avant de sensibiliser des souris au TNCB supprime la réaction d'HSC en régulant la réponse effectrice CD8⁺ (Ring *et al.*, 2006). Récemment, Vocanson *et al* ont identifié une nouvelle population de Treg qui exprime le marqueur ICOS : CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ICOS⁺, aux propriétés hautement suppressives, impliquée dans le contrôle de la réaction inflammatoire en réponse au DNFB. Lors de la phase de sensibilisation, ces Treg inhibent la prolifération des LT CD8⁺ spécifiques de l'haptène au sein des dLN. Cette population de Treg exprime fortement FoxP3 et CTLA-4 et produit de l'IL-10, l'IL-17 et de l'IFN γ (Vocanson *et al.*, 2010).

Enfin, les Treg peuvent également interagir dans les dLN avec les DC *via* des « gap junctions », inhibant ainsi l'interaction des DC avec les LT CD8⁺ (Ring *et al.*, 2010).

Enfin, chez l'Homme, Cavani *et al* ont démontré que les LT CD4⁺CD25⁺ isolés de patients allergiques au nickel ont une capacité à réguler les LT spécifiques du nickel limitée, contrairement aux LT CD4⁺CD25⁺ isolés d'individus sains (Cavani *et al.*, 2003a). Ceci suggère que les individus qui développent un EAC ont une fonction Treg défectueuse.

4.2.2. Les LT CD8+ supresseurs

Des Treg autres que CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ sont également impliqués dans le contrôle de l'EAC. Ils sont dépendants de la concentration de l'haptène et de l'exposition. En effet, l'application cutanée répétée de faibles doses d'une molécule allergisante telle que le TNCB induit une « fenêtre » de tolérance durant laquelle toute application de cet haptène à une dose sensibilisante optimale ne conduit pas au « priming » de T_{EFF} et n'entraîne pas d'EAC (Maurer *et al.*, 2003). Il s'agit de la « low-zone (low-dose) tolerance » LZT, qui est à ce jour considérée

comme le mécanisme courant de tolérance aux haptènes chez l'Homme. Cette LZT est médiée par des Treg CD8⁺ qui sécrètent de l'IL-4 et de l'IL-10, eux-mêmes générés en présence de Treg CD4⁺ (Maurer *et al.*, 2003). Il a récemment été démontré que les DC tolérogènes jouent un rôle primordial dans l'induction d'une LZT. En effet, ces DC sont présentes dans les dLN et sont activées par les LT CD8⁺ suppresseurs, ce qui va entraîner la libération de TNF α par ces DC tolérogènes. Le TNF α ainsi produit induit l'apoptose des LT CD8⁺ effecteurs spécifiques de l'haptène *via* le récepteur au TNF (Luckey *et al.*, 2011). La déplétion de LT CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ par un anti-CD25 durant l'induction de la tolérance par l'application de faibles doses de TNCB inhibe le développement d'une LZT et entraîne l'exacerbation de l'HSC en réponse au DNFB (Luckey *et al.*, 2012a). *In fine*, les DC tolérogènes permettent l'activation des Treg, indispensables à la mise en place d'une LZT. Ce phénomène de LZT est étudié pour réinduire un état de tolérance chez des patients allergiques (Luckey *et al.*, 2012b; Marc Vocanson *et al.*, 2006).

4.3. Les cellules T régulatrices non conventionnelles

4.3.1. Les lymphocytes T $\gamma\delta$

Les LT $\gamma\delta$ sont des LT intraépithéliaux exprimant le TCR V γ 5-V δ 1, appartenant à la famille des Cellules Dendritiques Epidermales T (DETC) décrites comme jouant un rôle régulateur dans l'inflammation cutanée (Girardi *et al.*, 2002). Girardi *et al* ont comparé l'effet de l'absence des cellules $\gamma\delta$ sur différents fonds génétiques murins. Ainsi, ils ont mis en évidence que les souris C57BL/6 déficientes pour le gène *tcr $\gamma\delta$* (*tcr $\gamma\delta$* ^{-/-}) développent une HSC normale en réponse au DNFB, tandis que les souris FVB et diabétiques non obèses (NOD) *tcr $\gamma\delta$* ^{-/-} développent spontanément une dermatite chronique, et développent une HSC majorée en comparaison aux souris WT en réponse au DNFB (Girardi *et al.*, 2002). Cependant, les souris invalidées à la fois pour les LT $\alpha\beta$ et les LT $\gamma\delta$ ne développent pas d'HSC, suggérant que cette pathologie est médiée par les LT $\alpha\beta$. Des transferts adoptifs de LT V γ 5⁺ (qui reconstituent les DETC) ou de LT V δ 1⁺ chez des souris FVB *tcr $\gamma\delta$* ^{-/-} ou NOD *tcr $\gamma\delta$* ^{-/-} diminuent l'HSC spontanée ou en réponse au DNFB, ce qui confirme le rôle régulateur des LT $\gamma\delta$ dans l'inflammation cutanée (Girardi *et al.*, 2002).

Cependant, plus récemment, il a été décrit que ces LT $\gamma\delta$ jouent un rôle pro-inflammatoire dans l'HSC : l'HSC en réponse au DNFB est réduite de 50% chez les souris B6.129P2-

Tcrd^{tm1Mom/J} (c'est-à-dire TCR $\delta^{-/-}$) par rapport aux souris sauvages (Nielsen *et al.*, 2014). L'IL-1 β sécrété par les KC en réponse au DNFB active les DETC qui produisent alors de l'IL-17, participant à l'inflammation cutanée d'origine allergique (Nielsen *et al.*, 2014).

4.3.2. Les lymphocytes NKT

Bien que les NKT représentent un faible taux des LT totaux (1 à 2% dans la rate de la souris et 0,01 à 2% dans le sang périphérique humain), ils sont décrits comme régulateurs négatifs de l'EAC. Ils interagissent avec les CPA exprimant le CD1d, présentant préférentiellement les glycolipides aux NKT. L'exposition de LC murines aux UVB induit une augmentation de l'expression de CD1d à leur surface. Les LC CD1d⁺ assurent le transport des Ag cutanés jusqu'aux dLN, où elles activent les NKT qui vont dès lors sécréter de l'IL-4, aux propriétés anti-inflammatoires (Fukunaga *et al.*, 2010).

Les NKT invariants (iNKT) expriment les chaînes invariantes du TCR α (V α 14J α 18 chez la souris, V α 24J α 18 chez l'Homme) et les récepteurs NK, et interagissent avec les CPA exprimant le CD1d. Les iNKT inhibent le développement d'une HSC médiée par les LT CD8⁺, et ce, indépendamment des LT CD4⁺ (Goubier *et al.*, 2013). La réponse inflammatoire induite par le DNFB est majorée chez des souris invalidées pour le gène *cd1d* et chez les souris invalidées pour le gène *J α 18*, chaîne du TCR des iNKT, en comparaison avec les souris sauvages (Goubier *et al.*, 2013). D'autre part, la déplétion des NKT chez la souris par l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-NK1.1 (PK136), avant la sensibilisation ou après le rappel par le DNFB induit une majoration de la réponse inflammatoire. Les LT activés par le DNFB vont sécréter de l'IFN γ et activer les iNKT qui vont produire de l'IL-4 et de l'IL-13 aux propriétés régulatrices. Les souris déficientes pour *il-4* et *il-13* développent une HSC majorée en réponse au DNFB par rapport aux souris sauvages (Goubier *et al.*, 2013).

4.4. Les lymphocytes B régulateurs

Les LT ne sont pas les seules cellules régulatrices de l'HSC : les LB régulateurs (Breg) sont également décrits comme pouvant intervenir durant la phase d'éllicitation dans le contrôle de l'EAC. Les Breg sont identifiés par leur phénotype CD1^{high}CD5⁺CD19 et représentent 1 à 2% des cellules B220⁺ présentes au niveau de la rate (Bouaziz *et al.*, 2008). Les Breg

produisent fortement de l'IL-10 (d'où leur appellation B10), qui leur confère leurs propriétés régulatrices. Les souris déficientes en LB (*cd19^{-/-}*) développent une HSC exacerbée en réponse au DNFB (R. Watanabe *et al.*, 2007). Des cellules du dLN issus de souris sauvages sensibilisées au DNFB sont transférées à des souris sauvages et des souris *cd19^{-/-}*. L'augmentation de l'épaisseur de l'oreille est majorée 5 et 10 jours après l'élicitation chez les souris *cd19^{-/-}* par rapport aux souris sauvages, soulignant ainsi l'importance des LB dans la régulation de l'HSC durant la phase tardive. Enfin, le transfert de Breg isolés de souris sauvages sensibilisées au DNFB à des souris *cd19^{-/-}* normalise l'HSC (R. Watanabe *et al.*, 2007).

5. Diagnostic et traitement de l'eczéma allergique de contact

5.1. Signes cliniques et histologiques de l'eczéma allergique de contact

L'intensité de l'EAC varie selon la concentration de l'allergène et le temps d'exposition. L'inflammation cutanée, due à l'activation des lymphocytes T spécifiques de l'haptène, se caractérise par un érythème et par la formation de papules et de vésicules suintantes prurigineuses, avant d'évoluer progressivement vers une sécheresse cutanée et une desquamation (Figure 28) (M Vocanson *et al.*, 2006). Les lésions sont tout d'abord limitées au site de contact avec l'allergène mais peuvent s'étendre rapidement. En absence de contact ultérieur avec l'allergène, les lésions inflammatoires régressent spontanément en 7 à 10 jours sans laisser de cicatrices. Cependant, si l'exposition à l'haptène persiste, l'eczéma peut devenir chronique. Cette forme est caractérisée par l'apparition de papules, d'une desquamation et d'une lichénification, épaissement de l'épiderme avec accentuation des lignes cutanées de disposition parallèle, avant d'évoluer en plaies et croûtes.



Figure 28. Lésions de l'eczéma allergique de contact

(Usatine and Riojas, 2010)

(A) (B) (C) : allergie au nickel contenu dans un piercing (A) dans une boucle d'oreille (B) et dans une ceinture (C) ; (D) Allergie à une chaussure ; (E) EAC professionnelle d'un ingénieur.

Au niveau histologique, les lésions sont caractérisées par un œdème et une vésiculation épidermique. La peau est également plus épaisse, ceci étant dû à une prolifération excessive des cellules épidermiques (acanthose) et une kératinisation anormale (parakératose). Le derme est le siège d'un infiltrat inflammatoire périvasculaire à prédominance lymphocytaire T (LT CD4⁺) (Saint-Mezard *et al.*, 2004).

Les altérations épidermiques sont plus prononcées dans l'eczéma aigu que dans l'eczéma chronique.

5.2. Diagnostic de l'eczéma allergique de contact

5.2.1. Le diagnostic

Le diagnostic de l'EAC repose sur les signes cliniques mais également sur l'historique personnel du patient. Le diagnostic débute avec un interrogatoire précis afin de mettre en évidence un contact éventuel avec une -ou des- substance(s) allergisante(s) présente(s) dans l'environnement quotidien ou professionnel. La prise de médicaments, l'utilisation de produits cosmétiques, l'exposition professionnelle, ainsi que la chronologie des symptômes

cliniques sont précisément renseignés. Cet interrogatoire va permettre d'orienter les tests épicutanés, appelés « patch tests ». Ces tests consistent à exposer le patient à divers agents allergisants potentiellement impliqués dans la réaction, afin de déclencher les lésions inflammatoires caractéristiques et confirmer ainsi l'allergène responsable des lésions.

Le diagnostic différentiel majeur de l'EAC est la dermatite d'irritation, qui résulte de l'exposition répétée à des molécules irritantes mais qui ne fait pas intervenir de mécanismes immunologiques spécifiques (Tableau 9) (Usatine and Riojas, 2010). La dermatite d'irritation est caractérisée par des lésions érythémateuses limitées à la zone de contact apparaissant dans les premières heures qui suivent l'exposition à l'agent irritant. Les patch-tests se révèlent négatifs mais l'altération de la barrière cutanée peut faciliter le développement d'un EAC (Jullien and Faure, 2000)

	Eczéma de contact	Dermatite d'irritation
Epidémiologie	Atteint quelques sujets en contact avec la molécule	Atteint la majorité des sujets en contact avec la molécule
Symptomatologie	Prurit	Brûlure
Délai d'apparition	Sensibilisation préalable puis déclenchement 24-48h après réexposition à l'allergène	Rapide, de quelques minutes à quelques heures après exposition à l'allergène
Lésions cutanées	Bords émiettés	Bords nets
Histologie	Spongiose, exocytose	Nécrose épidermique
Tests épicutanés	Positifs (lésions d'eczéma)	Négatifs (lésions d'irritation)

Tableau 9. Diagnostic différentiel entre l'eczéma de contact et la dermatite d'irritation
(Usatine and Riojas, 2010)

Le diagnostic différentiel ne sert pas uniquement à écarter une dermatite d'irritation, mais également d'autres pathologies cutanées telles que la dermatite atopique, la dermatite séborrhéique, le psoriasis, la dysidrose ou l'eczéma dysidrosique.

5.2.2. Les tests utilisés

Il existe plusieurs tests afin d'identifier la molécule responsable de l'EAC : les patch-tests et les tests d'application ouvert itératif (ROAT : Repetead Open Application Test).

Les patch-tests cherchent à reproduire la lésion en appliquant diverses molécules définies suspectées responsables de l'EAC chez le patient. Ils sont appliqués sur une zone limitée de peau saine du dos avec une série de molécules sous occlusion pendant 48h (Figure 28 A). Une première lecture est effectuée 48h après, et est suivie d'une deuxième lecture 72h après l'application. En fonction des réactions observées, le test est dit positif ou négatif (Figure 29 B) (Lachapelle and Maibach, 2012).

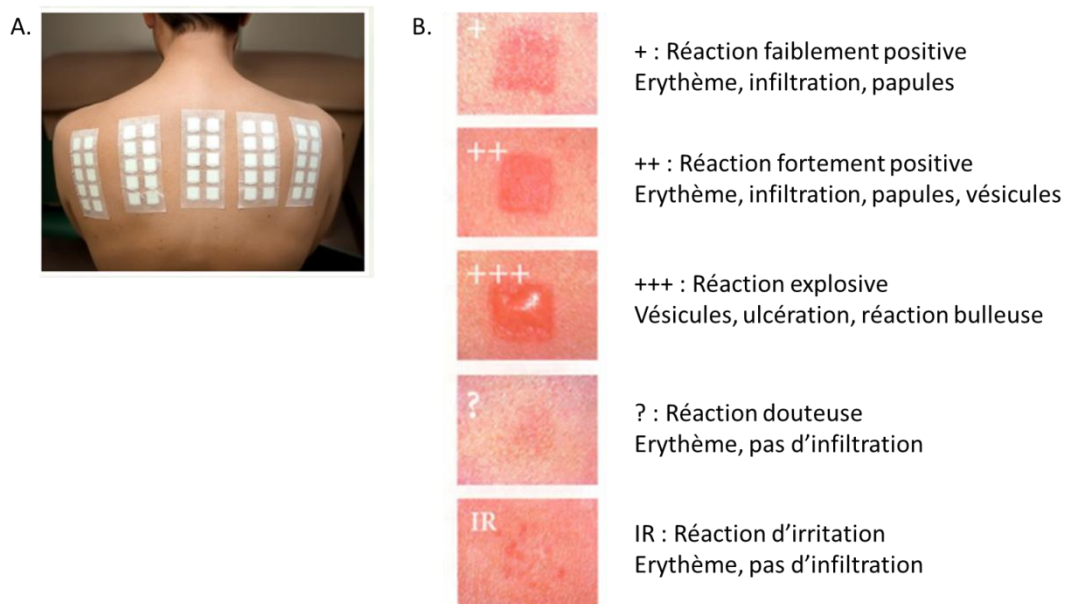


Figure 29. (A) Patch-tests (B) interprétation du patch test

Lorsque le patch-test n'est pas concluant, la réalisation de ROAT peut être prescrite. Le ROAT consiste à appliquer de très petites quantités de produit à tester deux ou trois fois par jour pendant une semaine au niveau du pli du coude ou de l'avant-bras. Vingt-et-un jours de tests sont parfois nécessaires pour mettre en évidence une réaction à un allergène faible (Goossens, 2011).

5.3. Le traitement de l'eczéma allergique de contact

Le traitement de l'EAC repose principalement sur l'éviction de l'allergène, d'où l'importance de l'identifier clairement. Cependant, un traitement symptomatique de la réaction inflammatoire est souvent prescrit, d'autant plus lorsque l'allergène responsable de l'EAC n'a pas encore été identifié. Le traitement consiste à appliquer d'abord des corticoïdes par voie topique tels que la bétaméthasone (pommade ou gel) deux fois par jour pendant deux semaines durant la phase suintante et lorsque celle-ci est achevée, le patient peut appliquer sur les lésions un émollient gras (Cold Cream ou Cerat frais). L'application de produits topiques d'hygiène courants doit être interrompue, seule la vaseline peut être utilisée sur les zones cutanées sèches (Habif *et al.*, 2012).

En cas d'aggravation de l'EAC par surinfection, le médecin prescrira des corticoïdes par voie orale tels que la dexaméthasone durant 3 à 7 jours. La surinfection cutanée sera traitée par antibiothérapie générale dirigée essentiellement contre le *staphylococcus aureus* (pristinamycine [Pyostacine] ou Amoxicilline + Acide Clavulanique [Augmentin]) (Saint-Mezard *et al.*, 2004).

L'EAC est donc une pathologie inflammatoire allergique répandue, dans laquelle les DC jouent un rôle essentiel. Les molécules allergisantes génèrent un stress oxydant et électrophile ; et il a été montré que le stress oxydant participe au processus de maturation des DC (Neves *et al.*, 2011). Il est désormais acquis que la réactivité chimique des molécules allergisantes envers les protéines est corrélée à la sensibilisation cutanée (Migdal *et al.*, 2013). Bien que la structure des allergisants cutanés soit très variée, la plupart d'entre eux sont électrophiles et possèdent une réactivité intrinsèque envers les groupes nucléophiles des protéines. Le stress électrophile et oxydant peut-être détecté par la voie Nrf2/Keap1, voie majeure impliquée dans la cytoprotection (Baird and Dinkova-Kostova, 2011).

III. La voie Nrf2/Keap1

La peau est tout particulièrement exposée à un stress environnemental (xénobiotiques, UV) et endogène (stress oxydant et nitrosant). Pour faire face à ces agressions, il existe de nombreux systèmes de défense endogènes qui font intervenir des mécanismes (1) non enzymatiques comme le glutathion et les vitamines A, E et C ; ainsi que (2) des mécanismes enzymatiques de détoxification des xénobiotiques : les enzymes d'hydroxylation de phase I, principalement le système du cytochrome P450 et les enzymes de conjugaison de phase II, telles que la Glutathion-S-Transférase ou la NADPH Quinone Oxydoréductase-1, permettant la métabolisation et l'élimination des xénobiotiques. La grande majorité des gènes codant pour les protéines anti-oxydantes et les enzymes de phase II est régulée par le facteur de transcription Nrf2 (Nuclear Factor erythroid-2-Related Factor 2).

1. Allergisants cutanés et stress oxydant

Comme décrit précédemment, les cellules cutanées sont en contact permanent avec l'environnement extérieur et sont sensibles aux effets de différents stimulants. Les irradiations UV, les xénobiotiques, les chocs thermiques perturbent le métabolisme cellulaire et par conséquent conduisent à la génération d'ERO et au déséquilibre de la balance rédox (Gęgotek and Skrzydlewska, 2015). Les ERO tels que l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 sont produits en conditions physiologiques par le métabolisme aérobie et ont un rôle de seconds messagers, participant ainsi à l'homéostasie cellulaire et à différents processus tels que la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Delattre *et al.*, 2005).

1.1. Le stress oxydant, un équilibre finement régulé

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre la production d'ERO et les capacités cellulaires antioxydantes. La plupart des ERO sont des espèces chimiques possédant un électron libre célibataire sur leur couche périphérique leur conférant un fort degré de réactivité. L' O_2 est indispensable à la production d'énergie sous forme d'ATP, mécanisme appelé phosphorylation oxydative, par l'intermédiaire de chaînes de transport

d'électrons présentes dans la membrane interne des mitochondries. En conditions physiologiques, la réduction de l'O₂ en eau se fait en plusieurs étapes successives qui donnent naissance à des intermédiaires appelés ERO (Figure 30).

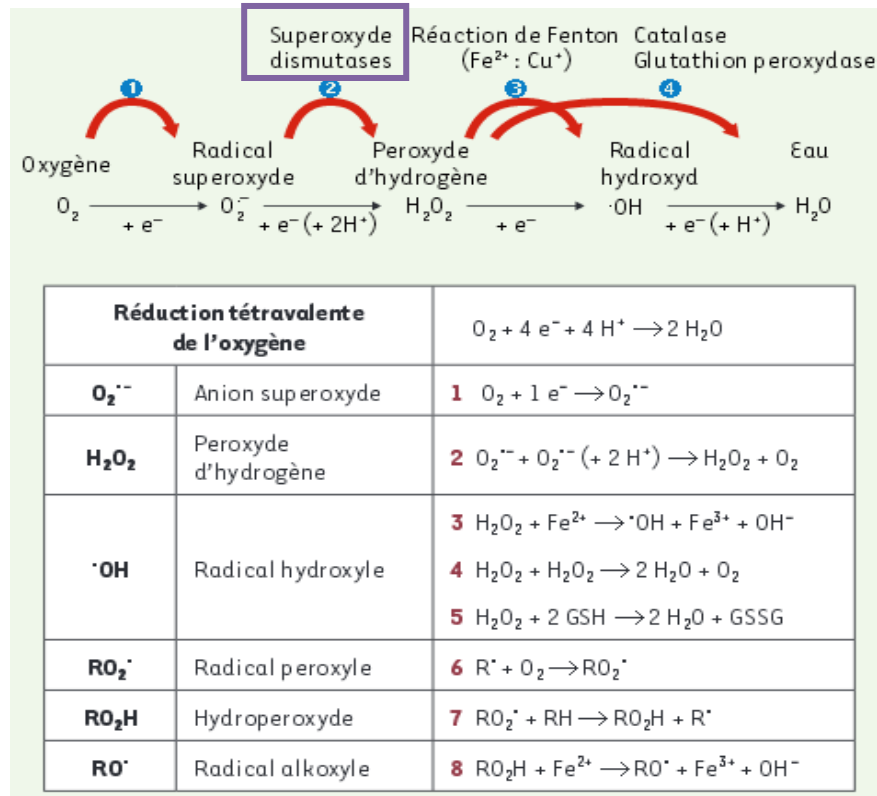
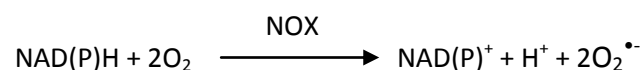


Figure 30. Origine des espèces réactives de l'oxygène
(Migdal and Serres, 2011)

Ainsi, environ 2% de l'oxygène consommé au niveau mitochondrial est transformé en radicaux superoxydes O₂^{•-} lors de première réduction électronique de l'oxygène. O₂^{•-} est rapidement transformé en H₂O₂ et O₂ par la superoxyde dismutase (SOD) (réaction n°2 dans la figure 30), mais peut également générer du peroxynitrite ONOO⁻ *via* sa réaction avec le NO[•] (Migdal and Serres, 2011).

En parallèle de la production d'ERO par le complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire, la plupart des cellules sont capables de produire de l'O₂^{•-} *via* une activité NAD(P)H oxydase membranaire (NOX). La NOX est une enzyme qui catalyse la réduction monoélectronique de l'O₂ en utilisant le NAD(P)H comme donneur d'électrons :



L'isoforme 2 de la NOX a été initialement étudiée dans les cellules phagocytaires où elle joue un rôle primordial dans la défense contre les pathogènes. Elle est localisée dans la membrane plasmique et dans certains granules spécifiques des neutrophiles, et existe également dans les autres cellules où elle participe à la signalisation cellulaire.

En plus des NOX, d'autres sources sont capables de générer des ERO. Parmi elles, la xanthine oxydase entraîne la formation d' $O_2^{\bullet-}$ en catalysant l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine au cours du métabolisme des purines (bases de l'ADN). Par ailleurs, les enzymes du réticulum endoplasmique dont la famille des cytochromes P450 assurent l'oxydation des acides gras insaturés et de nombreux xénobiotiques et réduisent l'oxygène moléculaire pour former $O_2^{\bullet-}$ et/ou H_2O_2 . Les peroxysomes (qui contiennent la myéloperoxydase responsable de l'acide hypochloreux) ainsi que le noyau (qui possède des cytochromes oxydases et une chaîne de transport d'électrons) sont également capables de produire de l' $O_2^{\bullet-}$ (Delattre *et al.*, 2005).

Enfin, il existe aussi des espèces réactives de l'azote (ERA), dont le principal représentant est le NO^{\bullet} synthétisé par les NO synthases et qui joue un rôle important de messager secondaire. Cependant, lorsqu'il est produit de façon excessive, le NO^{\bullet} est impliqué dans de nombreuses pathologies telles que l'athérosclérose ou les maladies neurodégénératives.

Un stress oxydant excessif dans la peau génère des produits d'oxydation tels que le 4-Hydroxynonéal (4-HNE) ou le malonealdéhyde, issus de la peroxydation lipidique, pouvant dénaturer les protéines, altérer l'apoptose et générer la production de cytokines pro-inflammatoires (Bickers and Athar, 2006). Ainsi, l'injection sous-cutanée de $NiCl_2$ à des rats entraîne la production d' HO^{\bullet} , augmentant la peroxydation lipidique (Athar *et al.*, 1987). Une production d'ERO élevée induit et maintient l'inflammation cutanée, participant ainsi au développement et à l'entretien de pathologies cutanées telles que l'EAC (Bickers and Athar, 2006).

1.2. Les Molécules allergisantes induisent un stress oxydant

Les molécules allergisantes cutanées peuvent produire des ERO dans les DC. L'utilisation d'une sonde 5-(et-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacétate (CM-H(2)DCFDA) a montré que des molécules connues pour induire un EAC telles que le DNCB,

l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) et le DNFB produisent des ERO dans les MoDC (Byamba *et al.*, 2010). Le traitement des MoDC par l'antioxydant N-acétylcystéine (NAC) inhibe cette production d'ERO (Byamba *et al.*, 2010). Le DNCB induit également la production d'ERO dans la lignée pro-monocytaire THP1 (Migdal *et al.*, 2010).

Le TNCB entraîne la production d'ERO dans la lignée de kératinocytes murins Pam212 et dans la lignée de fibroblastes murins L929. De plus, le TNCB génère des ERO *in vivo* dans la peau des oreilles après l'application cutanée de TNCB sur les oreilles de souris (Esser *et al.*, 2012). L'analyse immunohistochimique de biopsies cutanées de l'abdomen après application de TNCB montre la dégradation d'HA, qui est inhibée en présence d'antioxydants tels que la NAC. L'administration de NAC prévient non seulement la production d'ERO et la dégradation d'HA, mais inhibe également l'initiation de la phase de sensibilisation (Esser *et al.*, 2012). Ainsi, le TNCB entraîne la production d'ERO induisant la dégradation d'HA dans la MEC, et générant des signaux de danger indispensables à l'initiation d'un EAC (Esser *et al.*, 2012).

De plus, le stress oxydant induit par les allergisants active la voie des MAPK et la voie NF- κ B, (Neves *et al.*, 2011), ainsi que l'inflammasome, générant de l'IL-1 β et de l'IL-18 participant à la maturation des DC (Corsini *et al.*, 2013).

Bien que les molécules allergisantes aient des structures diverses et induisent un stress oxydant variable, elles possèdent une réactivité chimique intrinsèque envers les acides aminés nucléophiles.

Ce sont les propriétés oxydantes et électrophiles de ces molécules qui les rendent détectables par la voie Nrf2/Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), garante de l'équilibre redox cellulaire. La réactivité chimique des molécules allergisantes cutanées permet l'activation de la voie Nrf2/Keap1 au sein de la DC, permettant de réguler le stress cellulaire provoqué par la molécule allergisante (Migdal *et al.*, 2013).

2. La voie Nrf2/Keap1

Les cellules luttent contre les différents stress grâce à la combinaison de mécanismes de réparation et de défense antioxydante. Le système de défense antioxydante est le mécanisme de protection majeur ; les cellules utilisent les antioxydants pour neutraliser les ERO générées par les molécules oxydantes et/ou électrophiles. Les antioxydants « directs »

(glutathion et vitamines) ont une courte durée de vie, sont consommés durant le processus de détoxification et nécessitent d'être régénérés pour exercer leur effet protecteur. Les antioxydants « indirects », quant à eux, exercent leur effet *via* l'augmentation de l'expression de protéines telles que la NAD(P)H:Quinone Oxidoréductase-1 (NQO1), la Superoxide Dismutase (SOD), la Glutathione S-Transférase (GST), la Glutathione Peroxidase (GPx), l'Hème Oxygenase-1 (HO-1), la Glutamate-Cystéine Ligase (GCL), la catalase (CAT), et la Thioredoxine 1 (Trx1). Ces protéines ont une longue durée de vie, ne sont pas consommées durant le processus antioxydant, sont capables de catalyser une large variété de réactions de détoxification et sont impliquées dans la régénération de divers antioxydants directs comme le glutathion (GSH) (Dinkova-Kostova and Talalay, 2008). La régulation de la réponse antioxydante est assurée par le facteur de transcription Nrf2 et son inhibiteur endogène Keap1 *via* les séquences ADN « Antioxidant Response Elements » (ARE). La voie Nrf2/Keap1 régule au niveau transcriptionnel une batterie de protéines cytoprotectives participant ainsi activement au métabolisme et au maintien de l'équilibre rédox de la cellule.

2.1. Le facteur de transcription Nrf2

Le facteur de transcription Nrf2 a été identifié pour la première fois par *Moi et al* en 1994 comme un homologue du facteur de transcription érythroïde NF-E2 (Nuclear Factor Erythroid 2) capable d'interagir avec une séquence d'ADN contrôlant le gène de la β -globine (*Moi et al.*, 1994).

Nrf2 appartient à la famille Cap 'n' Collar (CNC) qui inclut également Nrf1, Nrf3, et les facteurs répresseurs Bric-a-brac/Tram-track/Broad complex (BTB) And CNC Homolog (Bach): Bach1 et Bach2. Tout comme Nrf2, Nrf1 permet la transcription des gènes ARE-dépendants, mais a une activité transcriptionnelle plus faible que Nrf2 (Zhang *et al.*, 2006). Nrf3, tout comme Bach1 et Bach2, joue un rôle de régulateur négatif dans l'expression des gènes ARE-dépendants (Sankaranarayanan and Jaiswal, 2004).

Nrf2 est exprimé de façon ubiquitaire : il est présent dans de nombreux organes détoxifiants comme le foie et les reins ainsi que dans la peau, les poumons, le tube digestif et les muscles (Baird and Dinkova-Kostova, 2011).

La protéine Nrf2 est composée de 605 acides aminés (a.a) chez l'Homme, et de 597 a.a chez la souris. Elle possède une région basique leucine zipper (bZIP) dans son domaine C-terminal, et est divisée en six domaines fonctionnels appelés Neh de 1 à 6 (Nrf2 ECH homology) (Figure 31) (Magesh et al., 2012a). La région basique Neh1, en amont de la région leucine zipper, permet la liaison à l'ADN au niveau des séquences ARE et la dimérisation avec d'autres facteurs de transcription de la famille bZIP tels que les protéines small musculoaponeurotic fibrosarcoma (sMAf) ou Jun. La région Neh2, proche de l'extrémité N-terminale, permet la liaison de Nrf2 à son inhibiteur endogène Keap1, *via* les motifs DLG et ETGE. Le domaine Neh2 possède des motifs spécifiques permettant la dégradation de Nrf2, appelés degrons. Ainsi, le motif DIDLID (a.a 17-32) permet le recrutement de l'ubiquitine ligase, et les motifs DLG (a.a 29-31) et ETGE (a.a 79-82) permettent à Nrf2 d'interagir avec Keap1 afin d'être dégradé à l'état basal (McMahon *et al.*, 2004). Les régions Neh3, Neh4 et Neh5 sont nécessaires à l'activation transcriptionnelle de Nrf2. Enfin, la région Neh6 possède deux degrons (a.a 329-339 et a.a 363-379) qui contrôlent la dégradation de Nrf2 dans le noyau par l'ubiquitine ligase E3 en réponse à un stress oxydant (McMahon *et al.*, 2004). De plus, les régions Neh1, Neh2 et Neh3 contiennent des séquences d'import nucléaire NLS (Nuclear Localization Sequence) et les régions Neh1 et Neh5 contiennent des séquences d'export nucléaire NES (Nuclear Export Sequence) (Magesh et al., 2012b).

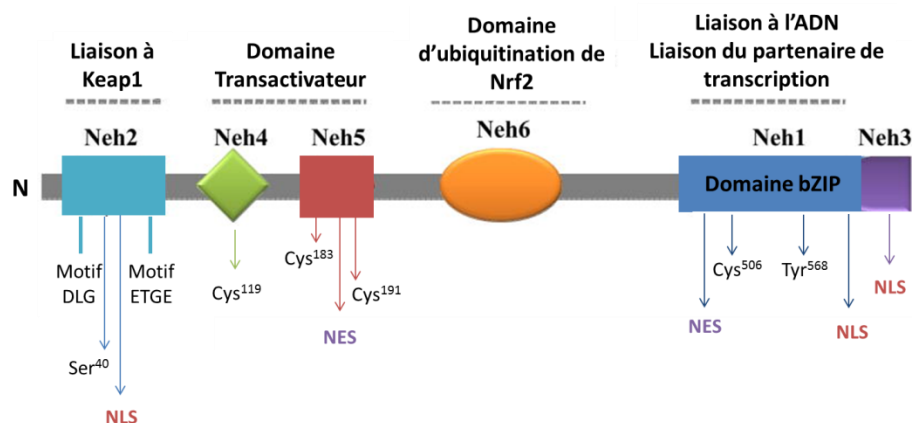


Figure 31. Structure et domaines fonctionnels de Nrf2

D'après Magesh *et al.*, 2012

bZIP : domaine leucine zipper basique ; CNC : cap 'n' collar ; NLS : nuclear localization signal ; NES : nuclear export signal

2.2. Keap1, le senseur endogène de Nrf2

2.2.1. Structure de Keap1

Keap1 est l'inhibiteur endogène de Nrf2 et permet l'ubiquitination et la dégradation de Nrf2 par le protéasome 26S. Il s'agit d'une protéine de 69 kDa formée de 624 a.a riches en groupements thiols : 25 cystéines chez la souris contre 27 cystéines chez l'Homme. Keap1 est un senseur de l'état rédox de la cellule : les nombreux résidus cystéines de Keap1 s'oxydent au contact d'ERO ou de molécules électrophiles modifiant ainsi la conformation du complexe Nrf2/Keap1 et altérant la liaison de Nrf2 avec Keap1.

Keap1 est divisé en cinq domaines fonctionnels : la région N-terminale, le domaine de dimérisation Broad complex Tramtrack and Bric-a-Brac (BTB), la région riche en cystéines InterVening Region (IVR), le domaine Double Glycine Repeat/Kelch (DGR) et la région C-terminale (Figure 32) (Magesh et al., 2012b). Les domaines DGR et C-terminal sont appelés le domaine Keap1-DC, qui interagit directement avec le domaine Neh2 de Nrf2 (Watai *et al.*, 2007). Le domaine BTB de Keap1 est responsable de l'homodimérisation et de l'interaction avec le complexe cullin 3/ring box 1 (Cul3/Rbx1) E3 ubiquitine ligase qui permet l'ubiquitination et la dégradation de Nrf2 par le protéasome 26S. Le domaine IVR est la région riche en cystéines sensibles aux réactions d'oxydation et possède également des séquences NES. A ce jour, sept cystéines ont été identifiées comme jouant un rôle majeur dans l'activité de Keap1 : Cys151, Cys257, Cys273, Cys288, Cys297, Cys434 et Cys613 (Magesh et al., 2012b). La Cys151 est située dans le domaine BTB et est importante pour le recrutement du complexe d'ubiquitination et de dimérisation de Keap1. Elle est indispensable à la stabilisation de Nrf2 en présence de molécules antioxydantes telles que le sulforaphane ou le tert-Butylhydroquinone (tBHQ) (Yamamoto *et al.*, 2008). Les Cys273 et Cys288, quant à elles, sont situées dans le domaine IVR et sont nécessaires pour la fixation de Nrf2 à Keap1 (Baird and Dinkova-Kostova, 2011).

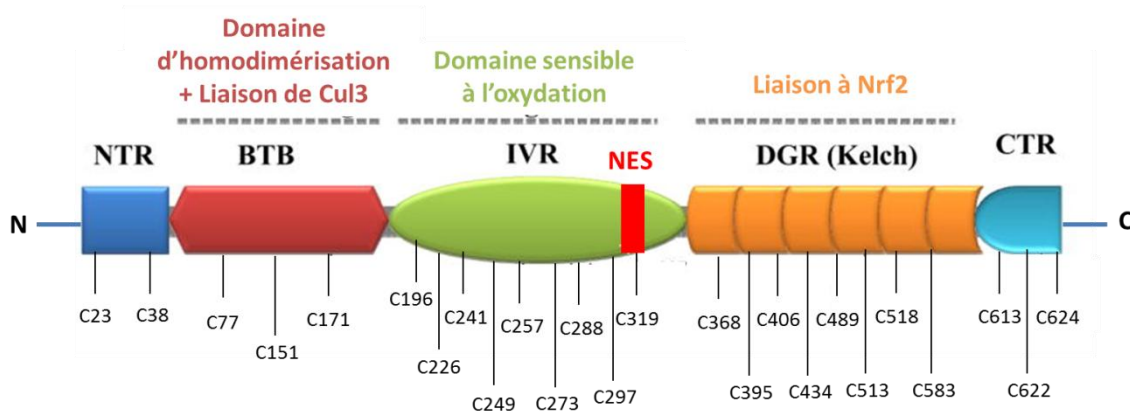


Figure 32. Structure et domaines fonctionnels de Keap1

D'après Magesh *et al.*, 2012

NTR : région N-terminale ; BTB : broad complex tramtrack and bric-à-brac ; IVR : interVening region ; DGR : double glycine repeat, CTR : région C-terminale ; NES : nuclear export signal

2.2.2. Le mécanisme d'interaction de Keap1 et Nrf2

A l'état basal, des analyses biochimiques et structurales ont montré qu'une protéine Nrf2 est liée à deux molécules de Keap1 *via* le domaine DGR de Keap1 et Neh2 de Nrf2 (Figure 33). Le complexe est organisé de telle façon que les cystéines du domaine IVR de Keap1 sont exposées à l'extérieur du complexe et peuvent ainsi détecter un stress cellulaire (D'Autreaux and Toledano, 2007). L'oxydation des cystéines de Keap1 va conduire à une modification de sa conformation et au non-recrutement du complexe d'ubiquitination, qui va alors cesser d'ubiquitiner et dégrader Nrf2 (Taguchi *et al.*, 2011). Ainsi, à l'état basal, le temps de demi-vie de Nrf2 n'excède pas 15 à 20 minutes.

Au sein du domaine Neh2 de Nrf2, il existe deux motifs DLG et ETGE qui se lient au domaine DGR de Keap1 avec une affinité différente. La liaison *via* ETGE est de forte affinité tandis que la liaison *via* DLG est de plus faible affinité. La région entre les motifs DLG et ETGE forme une hélice- α au sein de laquelle sont contenues sept lysines importantes pour l'ubiquitination de Nrf2 (Kit I Tong *et al.*, 2006).

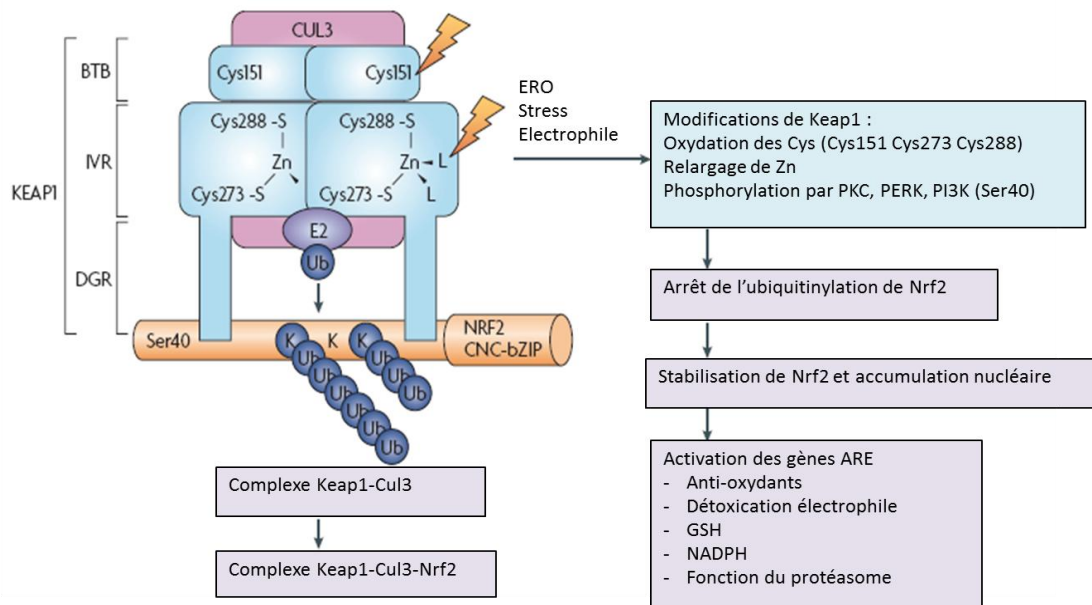


Figure 33. Modèle spéculatif d'interaction entre Nrf2 et Keap1

D'après D'Autreaux and Toledano, 2007

3. Les séquences Antioxydant Response Element et gènes cibles de Nrf2

3.1. Les séquences antioxydant response element

Les séquences ARE ont été identifiées pour la première fois par Rushmore *et al.* en 1991 par l'analyse du promoteur des gènes codant pour deux enzymes de détoxification de phase II : la sous-unité 2a de la *gst* (*gst2a*) et la *nqo-1* (Rushmore *et al.*, 1991). Les ARE sont des séquences d'a.a spécifiques retrouvées au niveau des promoteurs des gènes cibles de Nrf2. Elles sont situées généralement en amont de la séquence codante des gènes, dans la région régulatrice et se définissent comme suit : 5'-gagTcACaGTgAGtCggCAaaatt-3' (les bases majeures étant en majuscule), ou plus simplement TGA (C/T) nnn GCA ('n' indiquant n'importe quelle base) (Rushmore *et al.*, 1991).

Les séquences ARE partagent des similitudes avec des séquences spécifiques d'autres facteurs de transcription. Ainsi, le tétranucléotide 5'-TGAC-3' de la séquence ARE est similaire à la moitié du site consensus TPA (12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate) Response Element (**TRE**) : 5'-TGAGTCA-3' présent dans les promoteurs des gènes cibles du facteur de transcription AP-1 (Ma and He, 2012). AP-1 est formé d'un hétérodimère de protéines de la famille c-Fos, c-Jun et ATF (Activating Transcription Factor) et contrôle la

transcription de nombreux gènes impliqués dans la réponse cellulaire (prolifération, survie, inflammation) (Karin *et al.*, 1997). Il a été montré que Jun pouvait s'associer avec Nrf2 pour fixer les séquences ARE et permettait la transcription des gènes de détoxification (Venugopal and Jaiswal, 1998). Par ailleurs, les séquences ARE présentent des analogies de séquences pour celles de Maf Recognition Element (**MARE**), séquences consensus de fixation du dimère Maf. Les séquences MARE contiennent soit le cœur de la séquence TRE : 5'-TGCTGA G/C TCAGCA-3', soit l'élément de réponse de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) : 5'-TGCTGA GC/CG TCAGCA-3' (Dlakić *et al.*, 2001). Maf peut former soit un homodimère soit un hétérodimère avec d'autres facteurs de transcription de la famille bZIP.

Les séquences ARE présentent donc des similitudes avec d'autres séquences, permettant ainsi la combinaison de plusieurs hétérodimères possibles. Nrf2 peut s'hétérodimériser avec d'autres facteurs bZIP incluant Jun (c-Jun, Jun-D, and Jun-B) (Venugopal and Jaiswal, 1998), les petites protéines Maf [small Maf (sMaf) : MafG, MafK, MafF] (Itoh *et al.*, 1997) et la protéine ATF-4 (He *et al.*, 2001).

Parmi ces hétérodimères, le plus décrit est celui que forme Nrf2 avec **Maf**. L'affinité de fixation de Nrf2 aux séquences ARE est importante seulement en présence d'une sMaf et la fixation aux ARE entraîne la transcription des gènes cibles sur lesquels l'hétérodimère est fixé (Itoh *et al.*, 1997). Il a été montré que les **sMaf (MafG, MafK et MafF)** pouvaient non-seulement interagir avec Nrf2, mais également avec Nrf1, Nrf3, Bach1, Bach2, Fos et FosB pour fixer les ARE et/ou les MARE (Blank, 2008).

Le traitement de cellules d'hépatome murin par du chlorure de cadmium CdCl₂ induit l'expression **d'ATF-4** (He *et al.*, 2001). Par des expériences de co-immunoprécipitation et de double hybride, il a été mis en évidence que Nrf2 et ATF-4 forment un hétérodimère qui lie les séquences ARE pour permettre la transcription de l'ARNm codant pour *ho-1* en réponse au CdCl₂ (He *et al.*, 2001). De plus, l'inhibition d'ATF-4 ou de Nrf2 conduit à la diminution de l'expression de l'ARNm codant pour *ho-1*.

Par ailleurs, plusieurs études réalisées dans différents modèles cellulaires décrivent que Nrf2 forme un hétérodimère avec **c-Jun** afin de lier les séquences ARE. Dans les cellules

d'hépatome humain HepG2 traitées par du 4-HNE, il a été montré par chromatine-immunoprécipitation que c-Jun et Nrf2 lient les séquences ARE pour permettre la transcription des gènes cibles tels que les sous-unités de la GCS : la sous-unité *Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic (gclc)* et la sous-unité *Glutamate-Cysteine Ligase Modifier (gclm)* (Levy *et al.*, 2009). L'hétérodimère Nrf2 – cJun permet également l'expression de l'ARNm d'*ho-1* dans des astrocytes de rat en réponse au ter-buthyrdoquinone (tBHQ) (Park and Kim, 2014) et l'expression de *nqo-1* en réponse au β -naphtoflavone dans les cellules HepG2 (Venugopal and Jaiswal, 1998). Venugopal et Jaiswal ont également montré que Nrf2 peut s'associer avec les autres protéines de la famille de Jun : **Jun-B et Jun-D**, pour permettre la transcription de la *catalase* et de la *gst* (Venugopal and Jaiswal, 1998).

Tandis que certains hétérodimères permettent l'activation des gènes cibles de Nrf2, d'autres sont capables d'inhiber la transcription. En effet, Bach1 est un répresseur transcriptionnel qui s'hétérodimérise également avec les sMAf pour lier les ARE en absence de stress oxydant ou électrophile (Oyake *et al.*, 1996), ainsi que pour réguler l'activation de Nrf2 (Niture *et al.*, 2014). Il a été décrit que les hétérodimères MafG/K – Bach1 et MafG/K – MafG/K se lient aux séquences ARE entraînant l'inhibition de la transcription des gènes cibles antioxydants et de détoxification tels que *nqo-1* (Kaspar *et al.*, 2009).

3.2. Les différents systèmes antioxydants

Il existe de nombreux systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, endogènes ou non, pour éliminer les ERO.

3.2.1. Les antioxydants non-enzymatiques

Les thiols sont les principaux antioxydants non-enzymatiques endogènes. Il s'agit de composés organiques comportant un groupement sulfhydryle (-SH) lié à un atome de carbone. Le GSH est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine) qui représente le groupement thiol majoritaire au niveau intracellulaire capable de piéger directement les radicaux comme OH^\bullet , RO^\bullet , RO_2^\bullet et ONOO^- (peroxynitrite) (Halliwell and Gutteridge, 1990). Il participe à l'activité anti-oxydante de la GPx et est restauré sous forme réduite par la Glutathion Réductase (GR).

Les DC immatures isolées de moelle osseuse de souris *nrf2*^{-/-} (BMDC) ont un niveau basal de GSH plus bas comparé à celui des DC de souris sauvages (Yeang *et al.* 2012). L'électrophilie des molécules allergisantes est corrélée à leur potentiel sensibilisant et peut être évaluée *in vitro* par la capacité de la molécule à dépléter le GSH, utilisé comme modèle nucléophile (Aptula *et al.*, 2006).

L'organisme possède d'autres antioxydants non-enzymatiques endogènes, tels que la bilirubine, l'ubiquinol (ou coenzyme Q) et la mélanine. En effet, la mélanine, qui protège des rayons UV se comporte comme un piègeur de radicaux libres vis-à-vis de O₂^{•-}, RO₂[•]. La mélatonine, hormone produite par la glande pinéale, présente des propriétés antioxydantes vis-à-vis de OH[•] et H₂O₂ mais également des ERA comme le NO[•] et le peroxy-nitrite (Reiter *et al.*, 2001).

3.2.2. Les antioxydants enzymatiques : rôle crucial de Nrf2

Les antioxydants enzymatiques sont majoritairement régulés au niveau transcriptionnel par Nrf2. En effet, la très grande majorité des gènes antioxydants et de détoxification possèdent des séquences ARE au sein de leur promoteur et sont donc sous le contrôle de Nrf2. C'est le modèle murin déficient pour le gène *nrf2* qui a permis d'étudier ces gènes Nrf2-dépendants. La première observation a mis en évidence que le traitement des souris *nrf2*^{-/-} par l'antioxydant phénolique ter-Butylhydroxyanisole (BHA) n'induit ni l'expression protéique de la GST, ni l'expression génique de *nqo1* (Itoh *et al.*, 1997), mettant ainsi en avant leur contrôle par Nrf2.

Par la suite, des études de microarray ont élargi la connaissance de l'ensemble des gènes régulés par Nrf2. Le premier microarray réalisé à partir des cellules intestinales de souris *nrf2*^{+/+} et *nrf2*^{-/-} traitées par l'antioxydant sulforaphane a permis d'identifier un grand nombre de gènes régulés par Nrf2 (Thimmulappa *et al.*, 2002) et codant pour :

- **des enzymes de phase II** : *nqo1*, *gst*, *γ-glutamylcystéine synthétase (gcs)*, *l'uridine diphospho (UDP)- glucuronosyltransférase (ugt) 1A6*, *gsta1*, *a2*, *a3*, *a4*, *m1*, *m3* et *m4*
- **des enzymes permettant la régénération du NADPH** : *glucose-6-phosphate déshydrogénase*, *6-phosphogluconate déshydrogénase* et *l'enzyme malique*
- **des enzymes antioxydantes** : *gpx*, *gr* et *la ferritine*.

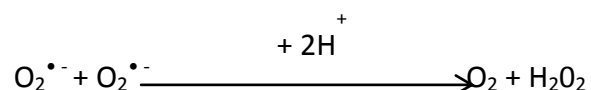
Par la suite, d'autres études de microarray ont poursuivi l'identification des gènes régulés par Nrf2. En 2003, Lee *et al.* ont comparé les profils géniques dans les astrocytes de souris

nrf2^{+/+} et *nrf2*^{-/-} en réponse à l'antioxydant tBHQ (Lee *et al.*, 2003) et ont ainsi identifié d'autres gènes Nrf2-dépendants :

- d'autres enzymes de phase II : *glc*, *époxyde hydrolase*
- d'autres enzymes antioxydantes : *cat*, *ferritine*, *ho-1*, *sod* et *Trx*

3.2.2.1. Les enzymes antioxydantes

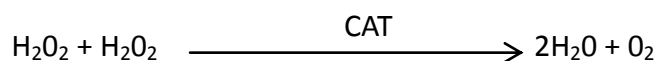
La Superoxide Dismutase (SOD) est une métallo-enzyme qui catalyse la dismutation du radical $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 :



Il existe trois isoformes de la SOD : SOD1, SOD2 et SOD3. La SOD1 contient du cuivre et du zinc (Cu, Zn-SOD) et est essentiellement cytoplasmique. Cependant, elle peut également être localisée dans l'espace intermembranaire des mitochondries, le noyau et les lysosomes. La SOD2 est mitochondriale, et quant à la SOD3, elle est localisée dans la matrice extracellulaire (Zelko *et al.*, 2002).

La SOD3 a été démontrée comme jouant un rôle dans le contrôle des pathologies cutanées. En effet, les patients souffrant de psoriasis ont un faible niveau protéique de SOD3, mesuré par immunomarquage sur des lésions psoriasiques (Kim *et al.*, 2011). Le traitement de souris par l'IL-23 induit une inflammation similaire à celle du psoriasis, qui est exacerbée lorsque les souris sont invalidées pour le gène de la *sod3* (Lee *et al.*, 2013). Cette étude suggère que la SOD3 participe au contrôle de l'inflammation dans une pathologie cutanée telle que le psoriasis. Enfin, des souris transgénique surexprimant le gène de la *sod3* ne développent pas d'HSC en réponse au TNCB (Na *et al.*, 2007). De plus, la SOD3 semble jouer un rôle dans la migration des DC : celle-ci est inhibée chez ces souris surexprimant la *sod3* (Na *et al.*, 2007).

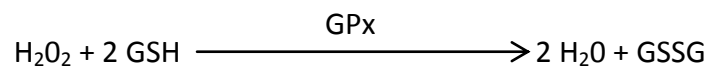
La catalase (CAT) est une hémoprotéine formée de quatre groupements hème. Elle catalyse la conversion de l' H_2O_2 en H_2O , et inhibe la formation de radicaux libres toxiques tels que le radical hydroxyle.



Elle est localisée dans les peroxysomes et bien qu'elle soit ubiquitaire, elle est présente à plus forte concentration dans le foie, les érythrocytes et les reins (Jung and Kwak, 2010).

Les cellules hépatiques de souris *nrf2*^{-/-} expriment plus faiblement la CAT à l'état basal comparées aux souris *nrf2*^{+/+} (Reisman *et al.*, 2009). L'administration d'allyle-nitrile, molécule activatrice de Nrf2, par gavage oral à des souris augmente l'expression de la catalase et de la quinone réductase. L'administration d'allyle-nitrile aux souris avant de traiter les oreilles par la molécule irritante huile de croton réduit l'inflammation cutanée induite par l'huile de croton. En neutralisant les ERO, la catalase et de la quinone réductase permettent une diminution de la réaction inflammatoire en réponse à l'huile de croton (Tanii *et al.*, 2012).

La glutathion peroxydase (GPx) est une sélénoprotéine qui permet la réduction de l'H₂O₂ par le GSH en H₂O et en GSH disulfure (GSSG), la forme oxydée du GSH (Migdal and Serres, 2011) :



Il existe cinq isoformes de cette enzyme : GPx 1, 2, 3, 4 et 6. La Gpx1 est ubiquitaire et présente dans le cytoplasme et la mitochondrie ; elle permet l'élimination de l'H₂O₂ et des hydroperoxydes lipidiques. La GPx2 est présente dans l'épithélium intestinal tandis que la GPx3 est une enzyme glycosylée extracellulaire plasmatique. La GPx4 est présente dans le cytoplasme, la mitochondrie et le noyau afin de protéger les phospholipides contre l'oxydation. Enfin, la GPx6 est exprimée dans l'épithélium olfactif.

La glutamylcystéine synthétase (GCS) est formée de deux sous unités : une sous unité catalytique GCLC et une sous-unité régulatrice GCLM. La GCS catalyse la synthèse du GSH par la formation du γ -glutamyl cystéine à partir du glutamate et de la cystéine en présence d'ATP. La GSH synthase permet ensuite l'ajout de glycine et générer ainsi le GSH (Figure 34) (Lu, 2013).

Le traitement de KC humains (HaCaT) par l'activateur de Nrf2 sulforaphane induit l'expression protéique de GCLC et GCLM (Macleod *et al.*, 2009).

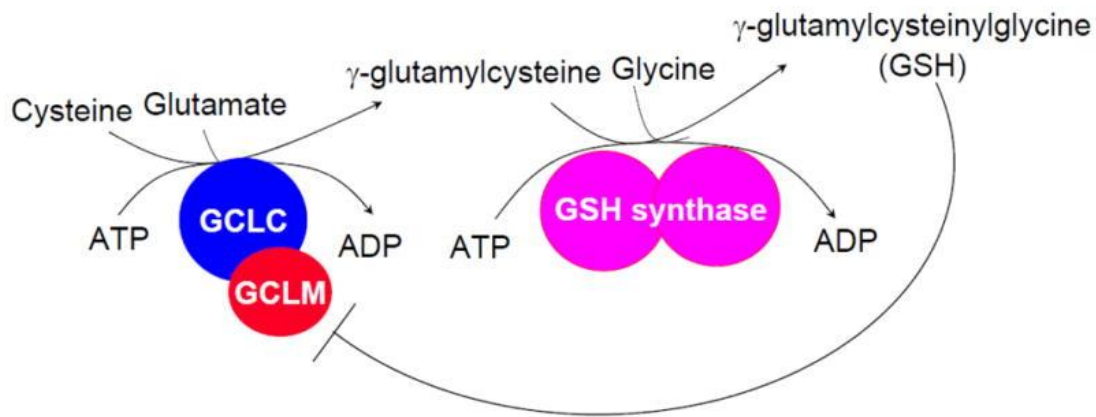


Figure 34. Synthèse du glutathion par la GCS
(Lu, 2013)

La thiorédoxine (Trx), localisée dans la membrane interne de la mitochondrie, est le substrat de la **peroxyrédoxine (Prdx)**. La Trx permet la réduction de l' H_2O_2 , du peroxyde lipidique et des protéines aux résidus sulfhydryles modifiés. La **Trx réductase (TrxR)** catalyse la réduction de la Trx oxydée grâce au NADPH (Figure 35) (Karlenius and Tonissen, 2010).

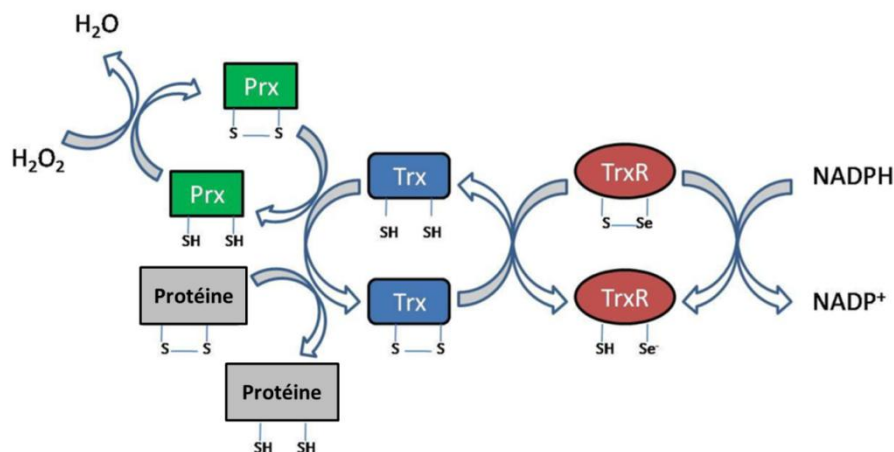


Figure 35. Le système thiorédoxine-thiorédoxine réductase
(Karlenius and Tonissen, 2010)

La Trx réduite catalyse la réduction de disulfides (s-s) des protéines oxydées telles que la Prx. Durant ce processus la Trx est oxydée avant d'être réduite par la TrxR en présence de NADPH.

L'inactivation de *nrf2* par ARN interférents inhibe l'expression de Trx et TrxR induite par le 4-HNE (Tanito *et al.*, 2007). Par ailleurs, il a été montré par PCR en temps réel que le traitement de MoDC avec la molécule allergisante acide Dinitrobenzène Sulfonique (DNBS) induisait une augmentation de la Trx (Ryan *et al.*, 2004).

L'hème oxygénase-1 (HO-1) est une enzyme qui catalyse la dégradation de l'hème en monoxyde de carbone (CO), en fer et en biliverdine. La biliverdine est elle-même transformée en bilirubine par la biliverdine réductase (BVR).

Le traitement des fibroblastes de la lignée L929 par du tBHQ induit l'expression des ARNm de *ho-1*. Cette induction est inhibée lorsque les cellules sont transfectées par un plasmide muté pour Nrf2 (Alam *et al.*, 1999). Les molécules allergisantes telles que le cinnamaldéhyde (CinA), dérivé de la cannelle retrouvé dans les parfums et les fragrances, induisent l'expression génique et protéique de HO-1 dans la lignée THP1 et dans des MoDC (Migdal *et al.*, 2013).

3.2.2.2. Les enzymes de phase II

La détoxification des xénobiotiques se déroule généralement en deux phases. Les réactions de phase I vont permettre une oxydation, une réduction ou une hydrolyse du substrat afin d'augmenter son hydrophilie. Puis la phase II consiste en un ensemble de réactions de conjugaison, qui ajoutent au substrat un groupement très polaire favorisant son élimination. Les enzymes de détoxification de phase II regroupent les enzymes de conjugaison telles que les GST et les UGT ainsi que les enzymes impliquées dans la réduction de métabolites réactifs telles que la NQO1. La plupart de ces enzymes sont régulées par la voie Nrf2/Keap1 (I M Copple *et al.*, 2010).

Les glutathion-S-transférases (GST) sont ubiquitaires et jouent un rôle important dans la détoxification des produits électrophiles endogènes et exogènes tels que les époxydes, les aldéhydes et les peroxydes. Les GST catalysent la conjugaison du GSH aux produits électrophiles afin d'en faciliter leur élimination. Ces enzymes existent sous plusieurs isoformes et sont présentes dans le cytoplasme, la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (Hayes *et al.*, 2010).

La NADPH quinone oxydoréductase (NQO1) est une protéine qui appartient à la famille des flavoprotéines homodimériques. NQO1 catalyse la réduction biélectronique des quinones en hydroquinones en présence de NADH ou NADPH. Cette protéine est présente dans la plupart des tissus excepté le foie et est particulièrement exprimée dans les tumeurs (Siegel *et al.*, 2012).

NQO1 est induit en réponse aux molécules allergisantes telles que le DNCB et le CinA dans les DC (Ade *et al.*, 2009; Migdal *et al.*, 2013).

De plus, Nrf2 régule d'autres gènes impliqués dans la détoxification de xénobiotiques. Il contrôle notamment l'expression génique des transporteurs d'efflux tels que les « multi drug resistance » (MDR) et les « multi resistance protein » (MRP) (Reisman *et al.*, 2009), les aldokéto-réductases (Macleod *et al.*, 2009) et les sous-unités 19S et 20S du protéasome (Kwak *et al.*, 2003). Les principaux gènes régulés par Nrf2 sont regroupés dans le tableau 10 (d'après la thèse de Zeina El Ali, 2013).

4. Les molécules modulatrices de la voie Nrf2/Keap1

4.1. Les activateurs de la voie Nrf2/Keap1

La plupart des activateurs de Nrf2 sont des composés électrophiles, capables de se lier de façon covalente avec les groupements –SH des cystéines des protéines par oxydation ou alkylation (Magesh *et al.*, 2012a). Ces molécules sont d'origine variée : phytochimique d'origine alimentaire, médicamenteuse, endogène, et chimique exogène comme les molécules allergisantes cutanées. Ces molécules allergisantes peuvent être des molécules phytochimiques telles que le géraniol, le CinA ou l'eugénol tous retrouvés dans les parfums et fragrances, des métaux tels que le nickel, des quinones comme l'hydroquinone et des accepteurs de Michael tels que le DNCB.

Fonction cellulaire	Gène régulé par Nrf2	Classe
Biosynthèse du glutathion	Gamma glutamylcystéine synthetase (γ -GCS)	GCS
	Glutamate cystéine ligase (GCL)	GCLC, GCLM
	Glutathion-S-transférase (GST)	GST A1, A2, A3, A4, M1, M2, M3, M4, M5
	Glutathione peroxydase (GPx)	GPX2
	Glutathion réductase (GR)	GR1
	Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH)	G6PDH
Métabolisme des xénobiotiques	NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1)	NQO1
	UDP-glucuronosyltransférase (UGT)	UGT1A1, A6, A9, 2B7
	Epoxyde hydrolase microsomal (mEH)	EPHX1
	Aldo-Kéto réductase (AKR)	AKR1B7, 1B8, 1B10, 1C1, 1C2 et 7A2
Réponse au stress	Hème oxygenase-1 (HO1)	HO-1
	Protéine de choc (Heat shock protein, HSP)	HSP1, 8, 40, 70, 105
Métabolisme du fer	Ferritine	FTL1, FTH1
Transporteurs	Multi-resistance protein (MRP)	MRP1, 2 et 3
Défense antioxydante	Superoxyde dismutase (SOD)	SOD1, 2 et 3
	Péroxyrédoxine (PRDX)	PRDX1, 6
	Thiorédoxine (TRX)	TRX
	Thiorédoxine réductase (TRXR)	TRXR1
	Catalase (CAT)	CAT
Autophagie	Séquestosome 1	SQSTM1
	p62	p62
Apoptose	Bcl-2	Bcl-2
	Bcl-xl	Bcl-xl
Protéasome	20S	PSBA1, PSMA4, PSMB3, PSMB5 et PSMB6
	19S	PSMC1, PSMC3 et PSMD14
	11S	Pa28 $\alpha\beta$

Tableau 10. Les gènes régulés par Nrf2

D'après Thimmulappa *et al.*, 2002; Kwak *et al.*, 2003a; Kwak *et al.*, 2003b; Hu *et al.*, 2006; MacLeod *et al.*, 2009; Jung and Kwak, 2010; Nitire and Jaiswal, 2012; Pickering *et al.*, 2012; Ma, 2013; Nitire and Jaiswal, 2013 (Thèse de Zeina El Ali, 2013)

Les inducteurs de Nrf2 peuvent être classés en plusieurs groupes, dont 4 sont décrits ci-dessous.

- **Les accepteurs de Michael**

Cette catégorie regroupe les molécules se liant aux cystéines de Keap1 pour former un adduit covalent (Figure 36). L'interaction entre Keap1 et Nrf2 sera perturbée et Keap1 n'assurera plus la dégradation de Nrf2, permettant ainsi sa stabilisation protéique et la transcription de ses gènes cibles (Magesh et al., 2012a). Ces accepteurs de Michael sont retrouvés au sein des produits phytochimiques tels que les curcuminoïdes, les coumarines, les chalcones, les flavonoïdes, les terpenoïdes et les dérivés de l'acool cinnamique comme la molécule allergisante **CinA** (Figure 36b).

Le diméthyl fumarate (DMF) (Figure 36c) a des propriétés anti-inflammatoires, immunomodulatrices et cytoprotectives et est utilisé dans le traitement de la sclérose multiple récidivante (Brennan *et al.*, 2015). Le DMF augmente l'expression des gènes antioxydants et la viabilité des neurones en présence de stress oxydant chez les souris *nrf2*^{+/+} mais pas chez les souris *nrf2*^{-/-}, suggérant que l'effet neuroprotecteur du DMF dépend de l'activation de Nrf2 (Scannevin *et al.*, 2012). De plus, il a été montré par spectrométrie de masse que le DMF modifie directement les cystéines Cys151, 257 et 273 de Keap1, entraînant la libération de Nrf2, sa translocation nucléaire et une augmentation du taux cellulaire de GSH (Brennan *et al.*, 2015). Par ailleurs, les propriétés anti-inflammatoires du DMF sont utilisées dans le traitement du psoriasis. Le traitement de patients atteints de psoriasis traités avec du DMF augmente l'expression de Nrf2 et du glutathion dans la peau lésée et régule négativement des facteurs de transcription impliqués dans l'inflammation tels que NF-κB (Onderdijk *et al.*, 2014).

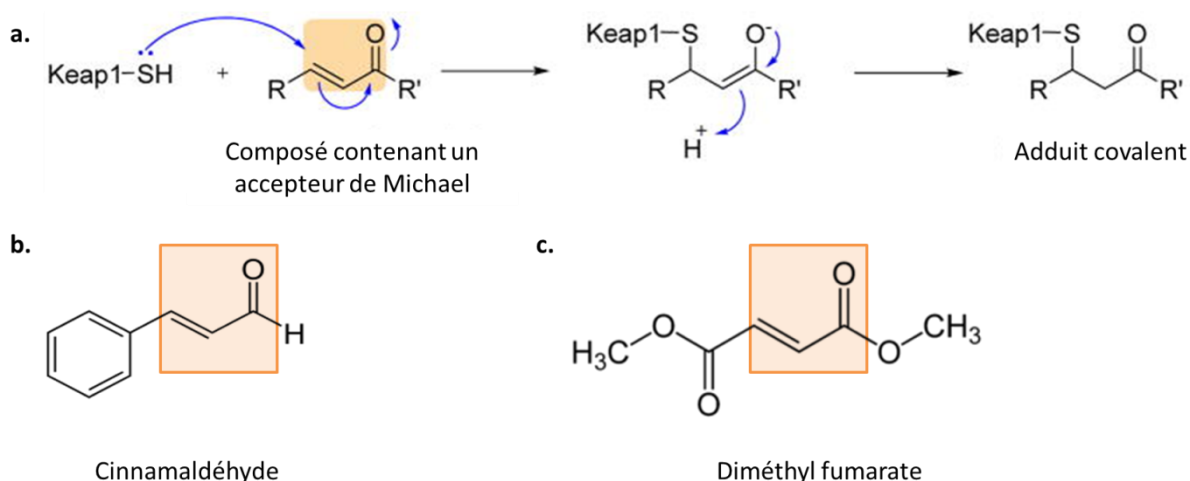


Figure 36. Réaction de l'addition de Michael et exemples d'accepteurs de Michael

(Magesh et al., 2012a)

a. Réaction de l'addition de Michael entre les accepteurs de Michael et les groupements sulfhydryles (-SH) des cystéines de Keap1

b. Structure du cinnamaldéhyde

c. Structure du diméthyl fumarate

• Les phénols et les quinones oxydables

Les composés phénoliques sont capables de neutraliser directement les ERO et sont utilisés comme antioxydants. Un des premiers antioxydants phénoliques décrit est l'hydroxyanisole butylé (BHA), capable d'induire des enzymes antioxydantes telles que HO-1 (Keum *et al.*, 2006). Ces composés sont de nature variable et interagissent avec les cystéines de Keap1 (Figure 37). Ils regroupent entre autres les flavonoïdes polyphénoliques tels que la quercétine, retrouvée dans les fruits et les légumes, le resveratrol, retrouvé dans les raisins rouges. Ces molécules induisent l'expression de Nrf2 et de ses gènes cibles *ho-1*, *nqo-1*, *gst*, *gcs*, *gr* et *gpx*. Le tBHQ est une quinone interagissant avec les cystéines cys151, cys273 et cys288 de Keap1, entraînant un changement de conformation du complexe Nrf2/Keap1 et une stabilisation de Nrf2 (Hur and Gray, 2011).

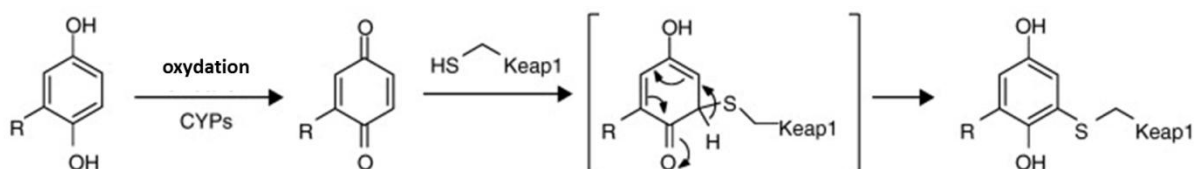


Figure 37. Interaction des quinones avec Keap1

(Hur and Gray, 2011)

- **Les isothiocyanates**

Les isothiocyanates (ITC) naturels se retrouvent dans les légumes crucifères tels que le brocoli et le chou. L'ITC le plus décrit comme activateur de Nrf2 est le sulforaphane, qui peut interagir avec les cys151, cys241, cys273, cys288, cys319, cys395, cys406, cys434, cys613, cys622 et cys624 de Keap1 (Hu *et al.*, 2011).

Le sulforaphane interagit de manière réversible avec Keap1 comme suit :

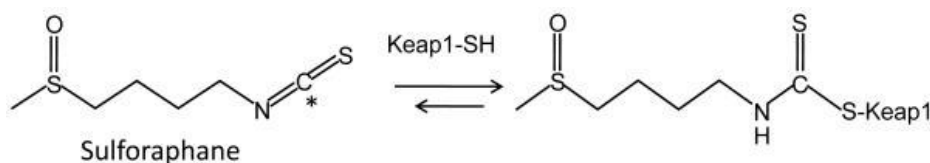


Figure 38. Mécanisme d'interaction du sulforaphane avec Keap1
(Hu *et al.*, 2011)

Le sulforaphane est un composé naturel retrouvé en très grande quantité dans le brocoli, possédant des propriétés chemopréventives et anti-cancéreuses. Le sulforaphane peut bloquer l'initiation des cancers via l'induction d'enzymes de phase II telles que NQO1 et les AldoKétoRéductases (AKR) pouvant détoxifier les carcinogènes (Kensler *et al.*, 2013). Le sulforaphane a montré des propriétés anti-néoplasiques *in vitro*, via l'inhibition de l'angiogénèse et de la progression du cycle cellulaire, et fait actuellement l'objet d'études cliniques en Chine afin de déterminer sa biodisponibilité (Egner *et al.*, 2011).

- **Les métaux**

Certains métaux lourds tels que le mercure (Hg), le cadmium (Cd) et le zinc (Zn) peuvent activer les gènes ARE dépendants (Magesh *et al.*, 2012a). Le Cd induit un stress oxydant qui active Nrf2 et la transcription de ses gènes cibles *ho-1* et *nqo-1* (He *et al.*, 2008). L'auranofine est un complexe organique contenant de l'or utilisé pour traiter les rhumatismes. L'auranofine dissocie le complexe Nrf2/Keap1 et induit l'expression de HO-1 dans les cellules synoviales et dans les monocytes issus de patients atteints de rhumatismes (N.-H. Kim *et al.*, 2010). Enfin, d'autres types de métaux, tels que le nickel, induisent l'accumulation de Nrf2 et l'expression de *ho-1* et *nqo-1* dans les CD34-DC (Ade *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'arsenic (As)

est un composé métalloïde qui entraîne l'accumulation de Nrf2 dans les macrophages (Bourdonnay *et al.*, 2009), les LT (Morzadec *et al.*, 2014) et les DC (Macocho *et al.*, 2015).

Par ailleurs, les inducteurs de Nrf2 contiennent d'autres catégories de composés tels que les dithioéthiones et sulfures de diallyle, les dimercaptans, les polyènes et les hydroperoxydes (Magesh *et al.*, 2012a).

4.2. Les molécules inhibitrices de Nrf2

Il a été plus récemment mis en évidence que Nrf2 pouvait avoir des effets néfastes car il permettait notamment à certaines tumeurs de développer une résistance aux chimiothérapies (X. J. Wang *et al.*, 2008). L'inactivation de Nrf2 représente donc un intérêt médical potentiel.

L'épigallocatechine-3-gallate (EGCG), polyphénol présent dans le thé vert, a un effet inhibiteur de Nrf2 à de fortes concentrations (200 μ M). La surexpression d'HO-1 induite par Nrf2 confère une résistance à l'apoptose de la lignée pulmonaire cancéreuse A549 (adénocarcinomateuse). Cependant, le traitement de la lignée A549 par l'EGCG à forte concentration induit une diminution de l'expression de Nrf2 et de HO-1, ainsi qu'une diminution de la fixation de Nrf2 aux séquences ARE (Kweon *et al.*, 2006). La diminution d'HO-1 par l'EGCG restaure l'apoptose des cellules résistantes.

L'acide tout-trans-rétinoïque (ATRA), ou rétinoïne, est un métabolite naturel de la vitamine A qui diminue *in vitro* et *in vivo* la liaison de Nrf2 aux séquences ARE en réponse au tBHQ. L'expression de gènes cibles de Nrf2 tels que *gclc*, *gsta1/2* ou *nqo1* est fortement diminuée dans les cellules intestinales de souris traitées par l'ATRA. En présence de l'ATRA, Nrf2 forme un complexe avec le récepteur alpha de l'acide rétinoïque dans le noyau, l'empêchant ainsi de se fixer aux séquences ARE (Wang *et al.*, 2007).

Le brusatol, composant de la plante aux propriétés anti-cancéreuses *Brucea javanica* augmente l'ubiquitination de Nrf2 par Keap1, entraînant ainsi sa dégradation et une

diminution des gènes cibles *gcs*, *mrp1/2* et *nqo1* dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses (Ren *et al.*, 2011).

La lutéoline, flavonoïde retrouvé dans divers aliments tels que le céleri, est un inhibiteur sélectif de Nrf2. La lignée cellulaire humaine A549 (cancéreuse pulmonaire) exprime constitutivement Nrf2. La lutéoline entraîne la dégradation des ARNm de *nrf2*, et par conséquent une forte diminution de l'expression génique et protéique de Nrf2 dans ces cellules, ainsi que de ses gènes cibles (*gclc*, *mrp2*, *nqo1*, *ho-1*) (Tang *et al.*, 2011).

L'ochratoxine A (OTA), est une mycotoxine produite par *Aspergillus* et *Penicillium* hautement toxique. Ses effets néphrotoxiques et carcinogènes peuvent être liés à l'inhibition de Nrf2, l'OTA empêchant la translocation nucléaire de Nrf2 et donc sa fixation aux séquences ARE et l'expression de ses gènes cibles (Boesch-Saadatmandi *et al.*, 2009).

La trigonelline est un alcaloïde retrouvé dans le café, et qui a récemment été décrit comme inhibiteur de Nrf2. Le traitement de cellules cancéreuses pancréatiques par la trigonelline entraîne une diminution de l'accumulation nucléaire de Nrf2 (Arlt *et al.*, 2012).

5. Mécanismes d'activation de la voie Nrf2/ Keap1

A l'état basal, Keap1 doit être sous forme d'un dimère pour inhiber Nrf2. Le domaine BTB de Keap1 lui permet d'interagir avec le complexe cullin 3/ring box 1 (Cul3/Rbx1) E3 ubiquitine ligase, favorisant ainsi l'ubiquitination et la dégradation de Nrf2 *via* la voie du protéasome 26S (Figure 39A) (Watai *et al.*, 2007).

A ce jour, plusieurs mécanismes d'activation de Nrf2 ont été proposés.

5.1. Le modèle hinge and latch

Dans le modèle "hinge and latch", la forte affinité du motif ETGE agit comme la charnière [hinge] afin de fixer Nrf2 à Keap1 alors que le motif de faible affinité agit comme le loquet [latch] permettant de bloquer l'ubiquitination de Nrf2 *via* son domaine Neh2 et d'inhiber sa dégradation par le protéasome (Tong *et al.*, 2006; Magesh *et al.*, 2012). Suite à un stress

oxydant, les résidus cystéines des domaines BTB et IVR de Keap1 sont alors oxydés, aboutissant à un changement de conformation de Keap1, et par conséquent une perturbation du motif DLG de faible affinité (Tong *et al.*, 2006). Ainsi, le motif DLG est dissocié de Keap1 tandis que le motif ETGE dont l'affinité est 100 fois plus élevée de celle du motif DLG, reste associé à Keap1 (Tong *et al.*, 2007). Echappant à la dégradation par le protéasome, Nrf2 s'accumule alors dans la cellule et les molécules de Nrf2 néo-synthétisées transloquent au noyau. Nrf2 s'hétérodimérise alors avec les protéines sMaf puis fixe les séquences ARE pour induire la transcription des gènes antioxydants et régulateurs de Nrf2 (Figure 39B) (Magesh *et al.*, 2012a).

5.2. Le changement conformationnel de Keap1 et sa dissociation d'avec Cul3

La stabilisation de Nrf2 peut se faire au travers de la modification de la conformation de Keap1. En effet, en présence d'un stress oxydant ou électrophile, la configuration de Keap1 est modifiée. Cette modification de Keap1 est caractérisée par l'oxydation de ses résidus cystéines tels que Cys151 (domaine BTB), Cys273 et Cys288 (domaine IVR) (Zhang and Hannink, 2003) et la libération de zinc aboutissant à une conformation ne permettant plus l'ubiquitination de Nrf2 (Kaspar *et al.*, 2009 ; Baird and Dinkova-Kostova, 2011).

Parmi ces cystéines, Cys151 semble avoir un rôle majeur. Lorsque cette Cys151 est oxydée, la conformation de Keap1 reste intacte mais l'activité du complexe Keap1-Cul3 E3 ligase est perturbée *via* une dissociation des deux protéines. Nrf2 reste alors fixé au dimère de Keap1 mais n'est plus ubiquitylé, et les molécules de Nrf2 néo-synthétisées ne seront pas dégradées (Figure 39C) (Egglar *et al.*, 2009). Une des premières expériences ayant identifié le rôle de Cul3 dans l'activation de la voie Nrf2/Keap1 a montré que le tBHQ et le sulforaphane entraînaient la dissociation de Keap1 et Cul3 (Zhang *et al.*, 2004).

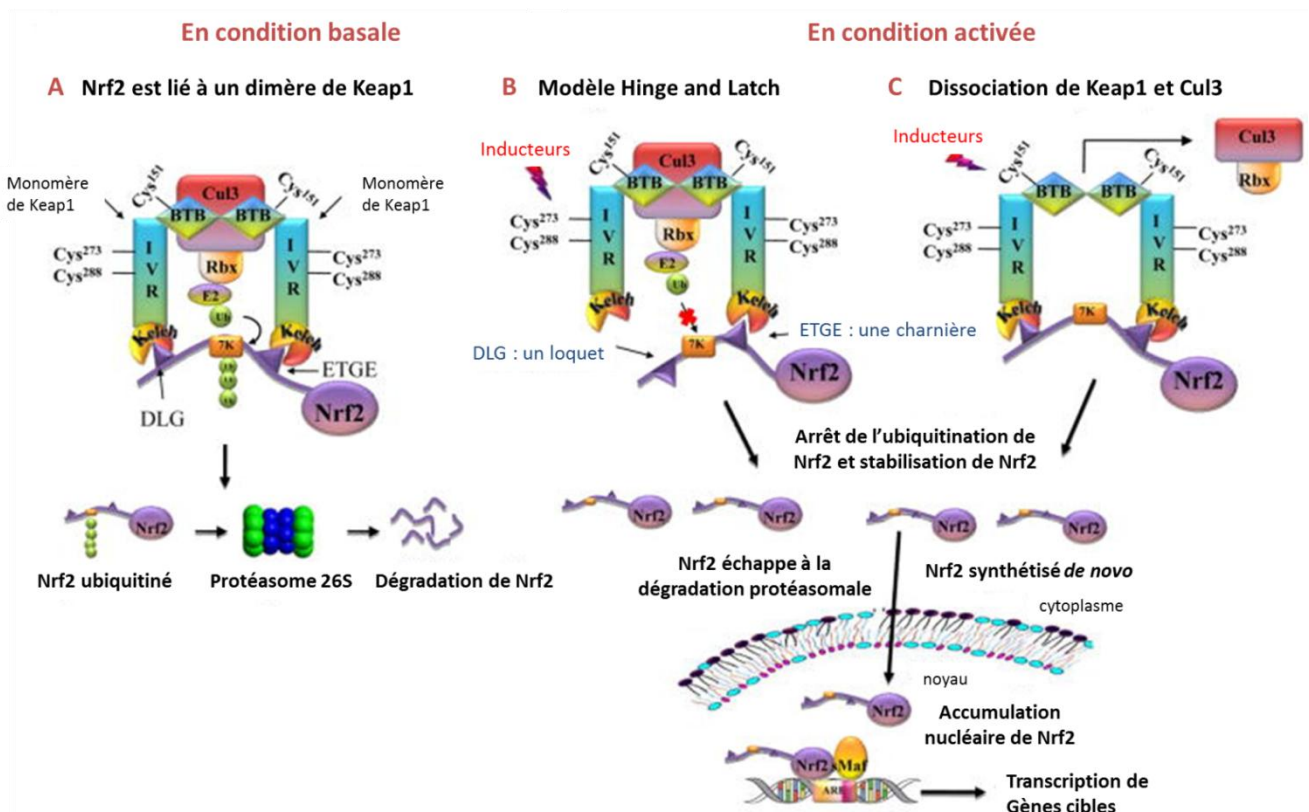


Figure 39. Mécanismes de stabilisation de Nrf2

D'après Magesh *et al.*, 2012

5.3. Le modèle de conformation cyclique

Plus récemment, le modèle « d'attachement et de régénération cyclique séquentiel » ou « conformation cyclique » a été mis en évidence (Baird *et al.*, 2014). En utilisant la méthode de Förster Resonance Energy Transfer (FRET) par Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) entre des protéines de fusion EGFP-Nrf2 and Keap1-mCherry (Figure 40), les auteurs définissent deux conformations du complexe Nrf2/Keap1 : lorsque Nrf2 est lié à Keap1 seulement par son domaine ETGE, le complexe est dit en conformation « ouverte » (Figure 40B). Lorsque Nrf2 lie un dimère de Keap1 par ses domaines DLG et ETGE, le complexe Nrf2/Keap1 est dit en conformation « fermée » (Figure 40C). En réponse au sulforaphane et au sulfoxythiocarbamate (STCA), deux activateurs de Nrf2, le complexe Nrf2/Keap1 est majoritairement en position fermée, suggérant qu'à l'état induit, le complexe Nrf2/Keap1 s'accumule en position fermée. Cette approche par FLIM-FRET a montré qu'à l'état basal, les molécules de Nrf2 néo-synthétisées fixent une molécule libre de Keap1 par leur domaine de haute affinité ETGE, générant un complexe Nrf2/Keap1 à l'état ouvert. Dans un second

temps, le domaine de faible affinité DLG de Nrf2 fixe une deuxième molécule du dimère de Keap1, générant ainsi un complexe Nrf2/Keap1 dans une conformation fermée. Cette conformation fermée permet une bonne orientation des lysines de l'hélice α de Nrf2 pour être ubiquitinylées par l'ubiquitine E3 ligase. Nrf2 ubiquitinylé est libéré du complexe et dégradé par le protéasome, et le dimère de Keap1 libéré peut se lier à de nouvelles molécules de Nrf2 néo-synthétisées (Figure 40D). Certains inducteurs de Nrf2 tels que le sulforaphane modifient les cystéines de Keap1, entraînant un changement de conformation de Keap1 tout en stabilisant le complexe Nrf2/Keap1 dans une conformation fermée. Ce changement de conformation ne permet plus l'ubiquitination ni la dégradation de Nrf2, bien que le complexe ne soit pas dissocié. Par conséquent, Keap1 n'est pas libéré et ne peut pas lier les molécules de Nrf2 néo-synthétisées (Figure 40E). Dans ce modèle, Nrf2 sert de substrat « suicide » pour inactiver Keap1 et permettre la translocation nucléaire du Nrf2 libre et ainsi la transcription des gènes cibles (Baird *et al.*, 2014).

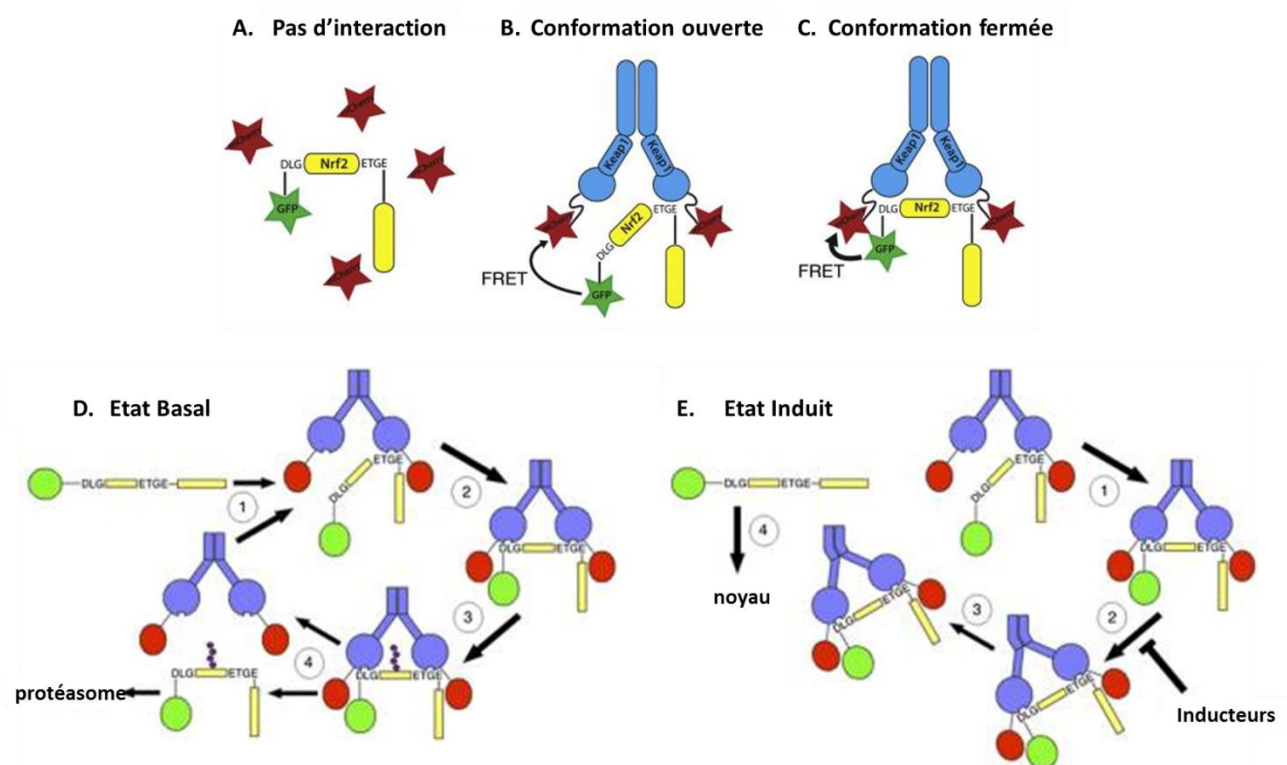


Figure 40. Modèle conformationnel cyclique du complexe Nrf2/Keap1

(Baird *et al.*, 2013; Baird *et al.*, 2014)

Des protéines de fusion Nrf2-GFP et Keap1-mCherry ont permis d'étudier le complexe Nrf2/Keap1 grâce à la méthode Förster Resonance Energy Transfer (FRET) par fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM).

5.4. L'oxydation des cystéines de Nrf2

Bien que l'attention soit beaucoup focalisée sur les modifications des cystéines de Keap1, les modifications des cystéines de Nrf2 seraient également impliquées dans l'activation de la voie. Nrf2 contient des NLS dans les domaines Neh2 et Neh1 ainsi que des NES dans les domaines Neh5 et Neh1. Une NES contenant un résidu cystéine réactif, Cys183, a été caractérisée dans le domaine de transactivation Neh5 (Li *et al.*, 2006). A l'état basal, le signal NES « domine » le signal NLS, permettant une localisation principalement cytoplasmique de Nrf2. Les inducteurs de Nrf2 tels que le tBHQ peuvent oxyder la Cys183, inactivant ainsi le signal NES et permettant une localisation nucléaire de Nrf2 (Li *et al.*, 2006).

Par ailleurs, d'autres cystéines de Nrf2 interviennent dans sa stabilisation. Les Cys235, Cys311, Cys316, Cys414 et Cys506 sont nécessaires à l'activation de Nrf2 et à la transcription de ses gènes cibles en réponse à l'arsenic et au tBHQ, en participant à la dissociation du complexe Nrf2/Keap1 et à l'arrêt de l'ubiquitinylation (He and Ma, 2009).

5.5. Autres mécanismes d'activation de Nrf2

D'autres mécanismes de régulation de la voie Nrf2/Keap1 sont également décrits, mettant en avant le rôle essentiel de Keap1 dans l'activation de Nrf2. En effet, la présence d'un signal d'export nucléaire dans le domaine IVR de Keap1 laisse suggérer l'existence d'une navette nucléo-cytoplasmique de Keap1. A l'état basal comme induit, une fois présent dans le noyau, Keap1 est capable d'inhiber l'interaction de Nrf2 sur ses séquences ARE, abrogeant ainsi son activation (Nguyen *et al.*, 2005). D'autre part, il a été montré qu'en réponse à certains activateurs de Nrf2 comme le tBHQ, Keap1 devient la nouvelle cible de la culline E3 ligase. Keap1 ainsi ubiquitiné est dégradé et permet l'activation de Nrf2 (Zhang *et al.*, 2005).

5.6. Voies d'activation de Nrf2

5.6.1. Rôle de la phosphorylation de Nrf2

5.6.1.1. La phase précoce d'activation

Lors de la phase de pré-induction, immédiatement après l'exposition cellulaire à un activateur de Nrf2, des tyrosines kinases encore inconnues à ce jour phosphorylent des

régulateurs négatifs de Nrf2 : Keap1Tyr85, FynTyr213, et Bach1Tyr486 menant à leur export nucléaire et à leur dégradation (Kaspar and Jaiswal, 2011; Kaspar *et al.*, 2012). La phosphorylation de la Tyr85 de Keap1 permet son export dans le cytoplasme, complexé avec Cul3 et Rbx1, où il sera dégradé par le protéasome (Kaspar *et al.*, 2012).

La phase précoce (ou d'induction) se déroule vraisemblablement en parallèle de la phase de pré-induction. En réponse aux antioxydants tels que le tBHQ, la modification des cystéines de Keap1 est suivie par la phosphorylation de la sérine 40 de Nrf2 située dans le domaine Neh2 par la **protéine kinase C** (PKC), permettant sa libération par Keap1 et sa translocation nucléaire (Niture *et al.*, 2009). Dès les années 2000, la PKC avait été identifiée comme importante dans l'activation de Nrf2 : son inhibition conduit à une diminution de l'expression des gènes cibles de Nrf2 en réponse au tBHQ tandis que son activation augmente l'expression des gènes cibles au sein de la lignée cellulaire HepG2 (Huang *et al.*, 2000). De plus, le stress oxydant conduit à l'activation de la PKC- δ par l'intermédiaire de l'activation de la famille de kinases Src (Konishi *et al.*, 1997).

Les MAPK sont des sérines-thréonines kinases également décrites comme phosphorylant Nrf2. Le tBHQ, le sulforaphane et le cadmium, tous des inducteurs de Nrf2, activent les MAPK (Alam *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 1999). L'inhibition d'ERK, JNK ou p38 MAPK conduit à une diminution de l'expression de l'activité de la GST en réponse à la molécule antioxydante dieckol dans les cellules HepG2, montrant l'implication des MAPK dans l'activation de Nrf2 (Lee *et al.*, 2015). Cependant, l'inhibition de p38 MAPK dans des hépatocytes humains HepG2 et murins Hepa1c1c7 augmente l'activité de la quinone réductase en réponse au tBHQ, suggérant que p38 peut contrôler négativement Nrf2 (Rong Yu *et al.*, 2000) et mettant ainsi en évidence que l'activation des kinases est modèle- et *stimulus*-dépendant (Baird and Dinkova-Kostova, 2011). Dans la lignée de kératinocytes HaCat, l'antioxydant celastrol génère des ERO, activant les voies ERK et p38 MAPK, elles-mêmes responsables de l'activation de Nrf2 et de la transcription de ses gènes cibles (Seo *et al.*, 2011). L'utilisation de la spectroscopie de masse a montré que plusieurs résidus sérines et thréonines de Nrf2 sont phosphorylés : Ser215, Ser408, Ser558, Ser577 et Thr559. Parmi eux, la Ser215, Ser408, et Ser577 sont des sites consensus de phosphorylation des MAPK (Sun *et al.* 2009). La mutation de sites individuels de phosphorylation n'a cependant pas d'effet sur l'activité de Nrf2, et la mutation des 5 sites entraîne seulement une modeste diminution de l'expression

des gènes ARE-dépendants (*ho-1*, *nqo-1* et *gclm*), créant une controverse quant au rôle des MAPK dans l'activation de Nrf2 (Sun *et al.* 2009).

La protéine kinase CK2 (caséine kinase 2) joue un rôle important dans l'activation de Nrf2. Dans plusieurs lignées (kératinocytes HaCaT, hépatocytes HepG2), Nrf2 est phosphorylé par la CK2 et la forme phosphorylée de Nrf2 augmente en présence d'inducteurs tels que l'arsenic (Pi *et al.*, 2007). De plus, le traitement de la lignée cellulaire IMR-32 (neuroblastome humain) par le tBHQ induit l'expression de la protéine Nrf2 sous forme de 2 bandes visibles en Western blot (Apopa *et al.*, 2008). La bande de plus haut poids moléculaire (PM) de Nrf2 disparaît en présence d'une phosphatase recombinante, correspondant donc à un état phosphorylé. La délétion successive des différents domaines de Nrf2 a mis en évidence l'importance de la phosphorylation du domaine de transactivation contenant Neh4 et Neh5 dans l'activité transcriptionnelle de Nrf2. Ce domaine contient de nombreux sites consensus de phosphorylation par la CK2 et est phosphorylé *in vitro* par la CK2 (Apopa *et al.*, 2008). L'inhibition de la CK2 par le 2-diméthylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole (DMAT) inhibe l'activité du domaine de transactivation de Nrf2 et l'expression protéique de HO-1 et NQO-1. La phosphorylation du domaine de transactivation de Nrf2 par la CK2 permet la translocation nucléaire de Nrf2 et la transcription de ses gènes cibles (Apopa *et al.*, 2008). Par ailleurs, les lipides oxydés induisent un stress cellulaire et activent Nrf2 dans les cellules endothéliales (Afonyushkin *et al.*, 2011). L'inhibition de la CK2 par le 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazole (TBB) ou par siRNA inhibe l'expression de Nrf2 et de ses gènes cibles *nqo-1*, *ho-1* et *gclm* (Afonyushkin *et al.*, 2011).

Nrf2 a également été décrit comme phosphorylé par la **phosphatidyl inositol-3-phosphate kinase (PI3K)**. L'extrait de la plante Feverfew aux propriétés antioxydantes induit l'activation de Nrf2 et l'activité ARE, mesurée par un test luciférase, dans les kératinocytes humains NHEK et diminue les dommages à l'ADN induits par l'irradiation UV (Rodriguez *et al.*, 2013). L'inhibition de PI3K par l'inhibiteur pharmacologique LY294002 inhibe la liaison de Nrf2 sur les séquences ARE ainsi que l'effet protecteur de l'extrait de Feverfew sur l'ADN, soulignant l'importance de PI3K dans l'activation de Nrf2 dans les kératinocytes (Rodriguez *et al.*, 2013). Suite à ces phosphorylations, variables selon la nature de l'inducteur et le modèle cellulaire utilisé, Nrf2 va s'hétérodimériser avec un autre facteur de transcription tel que Maf ou c-Jun

afin de se fixer sur les séquences ARE entraînant la transcription des gènes cibles cytoprotecteurs (Figure 41A).

5.6.1.2. La phase tardive de phosphorylation de Nrf2

Enfin, la phase tardive (ou de post-induction) permet l'arrêt de l'activation de Nrf2 *via* la Glycogen Synthase Kinase 3 beta (GSK3 β). La phosphorylation de Nrf2 par la GSK3 β entraîne l'inhibition de sa fixation aux séquences ARE du promoteur de *ho-1* et l'inhibition de son export nucléaire (Salazar *et al.*, 2006).

Nrf2 possède 10 sites putatifs de phosphorylation par GSK3 β . La GSK3 β est activée par une phosphorylation sur sa Tyr216 en réponse à l'H₂O₂ dans les cellules HepG2. La GSK3 β agit en amont de la kinase Fyn en la phosphorylant au niveau de ses résidus thréonines, actuellement inconnus, et induit sa translocation vers le noyau (Jain and Jaiswal, 2007). Fyn s'accumule alors dans le noyau et permet la phosphorylation de Nrf2 au niveau de sa Tyrosine 568 permettant ainsi son export nucléaire *via* l'exportine crm1 (chromosomal region maintenance-1) (Jain and Jaiswal, 2006). En parallèle, Keap1, exporté du noyau durant l'activation de Nrf2, est réimporté dans le noyau complexée avec Cul3 et Rbx1. Il peut dégrader Nrf2 directement dans le noyau ou bien exporter Nrf2 vers le cytoplasme pour permettre son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Figure 41B) (Kaspar *et al.*, 2012).

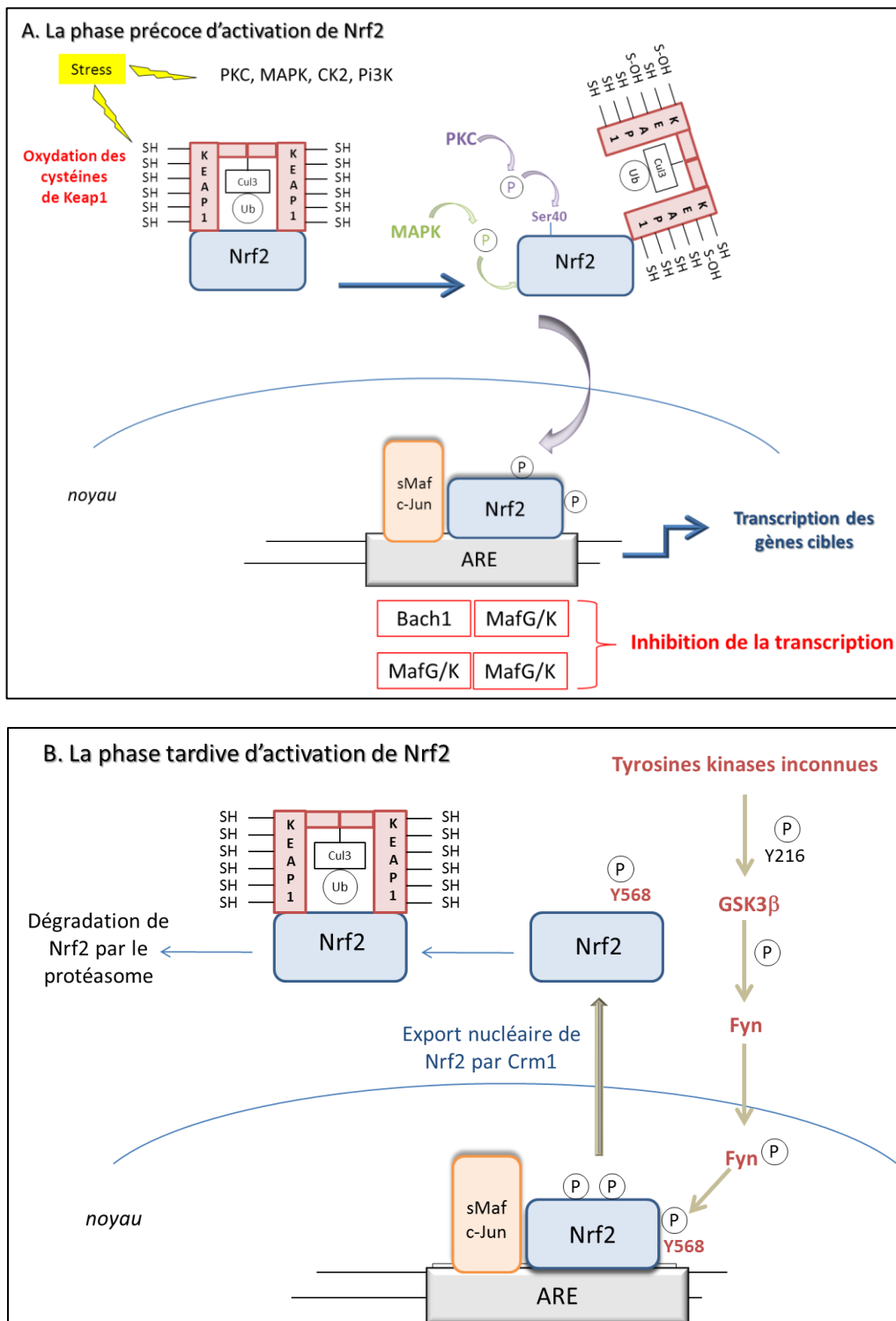


Figure 41. La phase précoce et la phase tardive de l'activation de Nrf2

A. La phase précoce : activation de la transcription des gènes cibles

B. La phase tardive : export nucléaire de Nrf2 et arrêt de la transcription des gènes cibles

5.6.2. Modification post-traductionnelles de Nrf2

5.6.2.1. L'acétylation et désacétylation de Nrf2

En plus des mécanismes de phosphorylation, il a été décrit que les phénomènes d'acétylation/désacétylation par les co-activateurs transcriptionnels p300 et CBP [CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein)-binding protein] jouent un rôle dans l'activation de la voie Nrf2. En effet, l'inhibition de CBP par la protéine adénovirus E1A diminue significativement l'activité de Nrf2 (Katoh *et al.*, 2001). Il a été montré que CBP se lie à Nrf2 au niveau du domaine transactivateur Neh4 et Neh5 (Katoh *et al.*, 2001).

Le complexe CBP/p300 permet le recrutement de l'ARN polymérase II qui participe à la transcription des gènes cibles. Le traitement de cellules rénales HEK293T par l'arsenic As(III) entraîne l'acétylation des résidus lysines du domaine Neh1 de Nrf2 par le complexe CBP/p300 possédant une activité histone acétyltransférase intrinsèque (Zheng Sun *et al.*, 2009). L'acétylation de Nrf2 augmente sa localisation nucléaire, tandis que sa désacétylation entraîne sa localisation cytoplasmique (Kawai *et al.*, 2011). La désacétylation de Nrf2 par la désacétylase Sirtuine 1 résulte en une inhibition de la fixation des séquences ARE et en l'export nucléaire de Nrf2 (Kawai *et al.*, 2011).

Cependant, le rôle de l'acétylation de Nrf2 est controversé. En effet, plusieurs études montrent que la désacétylation de Nrf2 par l'Histone Désacétylase 2 (HDAC2) conduit à sa stabilisation et une augmentation de la transcription de ses gènes cibles. Des cellules épithéliales bronchiques BEAS2B traitées par un inhibiteur HDAC, la trichostatine A, montrent une augmentation de l'acétylation de Nrf2 et une diminution de sa stabilisation en présence d'H₂O₂ avec une diminution de l'expression de l'ARNm codant pour *ho-1* (Mercado *et al.*, 2011). La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est une pathologie inflammatoire dans laquelle le stress oxydant joue un rôle important. La BPCO est caractérisée par une diminution de l'activité d'HDAC2 conduisant à une diminution de la stabilité de Nrf2 et par conséquent une diminution de la transcription des gènes cibles antioxydants (Mercado *et al.*, 2011).

5.6.2.2. Régulation par les microRNAs

Les microRNAs (miR) sont de courts ARN simple-brin non codants de 20 à 23 nucléotides de longueur. Une fois matures, ces miRs forment un complexe appelé RISC (RNA-induced silencing complex) avec des protéines Argonautes. Ce complexe se lie aux ARNm cibles au niveau de la région 3'-UTR (partie de l'ARNm qui suit le codon STOP) afin de les dégrader ou d'inhiber leur traduction pour empêcher leur expression (Yang *et al.*, 2011). Plusieurs études ont montré que les miR sont impliqués dans la régulation de Nrf2, tels que miR-144, miR-28, miR-200, miR-34. L'expression de miR-144 réduit le niveau protéique de Nrf2, diminue la régénération du glutathion et altère le pouvoir antioxydant des cellules érythroïdes (Sangokoya *et al.*, 2010). D'autre miR, tels que miR-200 et miR141, entraînent la dégradation non pas de Nrf2, mais de Keap1, entraînant une hyperactivation de Nrf2 (Eades *et al.*, 2011).

5.6.3. Modifications de Keap1 et les conséquences sur l'activation de Nrf2

Certains activateurs de la voie Nrf2 tels que le tBHQ et N-iodoacetyl-N-biotinylhexylenediamine (IAB) ont un mécanisme d'action original : ils entraînent l'ubiquitination de Keap1 par la Cul3 (Hong *et al.*, 2005). Le traitement de cellules HEK293 transfectées avec une construction FLAG-Keap1 par IAB et tBHQ génèrent une forme de haut PM de Keap1, identifiée comme étant ubiquitinée par Western blot et chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (Hong *et al.*, 2005).

A l'état basal, la Tyr141 de Keap1 est constitutivement phosphorylée, permettant sa stabilisation et sa dimérisation avec Nrf2 afin de dégrader Nrf2. Le traitement des cellules Hepa1 avec de l'H₂O₂ mène à la déphosphorylation de la Tyr141 de Keap1, le rendant ainsi instable et permettant la libération de Nrf2 qui va dès lors transloquer au noyau (Jain *et al.*, 2008). D'autre part, le traitement de cellules HepG2 par le tBHQ induit la phosphorylation de la Tyr85 de Keap1. Cette phosphorylation permet rapidement l'export nucléaire et la dégradation de Keap1 complexé avec Cul3 et Rbx1, permettant ainsi la transcription des gènes cibles (Kaspar *et al.*, 2012). Lors de la phase tardive, Keap1 est réimporté dans le noyau pour dégrader Nrf2 (Sun *et al.*, 2007) ou transporter Nrf2 hors du noyau pour être dégradé dans le cytoplasme (Velichkova and Hasson, 2005) et stopper la transcription des gènes cibles.

5.6.4. Les protéines partenaires de Keap1

L'activation de Nrf2 peut-être directe par des actions de phosphorylation, d'ubiquitination et d'acétylation ou *via* la modulation de Keap1, mais l'activation de Nrf2 peut également être indirecte via des protéines qui interagissent avec Keap1 pour en moduler la fonction.

La prothymosine alpha (PTM α) est une protéine ubiquitaire qui interagit avec le domaine Kelch de Keap1 pour lui permettre de transloquer au noyau complexé avec Cul3 et Rbx1. Dans le noyau, PTM α se dissocie de Keap1 qui peut dès lors interagir avec Nrf2 afin de permettre son ubiquitination et sa dégradation (Niture and Jaiswal, 2009).

L'importine α 7 ou protéine karyophérine α 6 (KPNA6) est également impliquée dans la navette nucléo-cytoplasmique de Keap1. Keap1 fait constamment la navette entre le noyau et le cytoplasme (Sun *et al.*, 2011). Tout comme la PTM α , l'importine α 7 interagit avec le domaine Kelch de Keap1 et permet son import nucléaire. Une fois dans le noyau, Keap1 interagit avec Nrf2 pour le transporter hors du cytoplasme et le dégrader, entraînant une diminution de la transcription des gènes cibles en réponse au tBHQ. L'invalidation de l'importine α 7 par siRNA entraîne une augmentation de l'activation de Nrf2 (Sun *et al.*, 2011).

L'I κ B kinase β ou IKK β est l'activateur de du facteur de transcription NF- κ B et est également décrit comme une protéine partenaire de Keap1 (Lee *et al.*, 2009). NF- κ B est formé de deux sous-unités p50 et p65 et est lié à l'état basal à son inhibiteur endogène I κ B. NF- κ B permet la transcription d'une myriade de gènes impliqués dans la réponse immunitaire, l'inflammation, la prolifération cellulaire et l'invasion tumorale (Karin and Greten, 2005). IKK β phosphoryle les résidus Ser32 et Ser36 d'I κ B entraînant la dégradation d'I κ B par le protéasome. Parallèlement, IKK β phosphoryle également la sous-unité p65 de NF- κ B entraînant ainsi l'activation de NF- κ B. IKK β possède un motif ETGE similaire à celui de Nrf2, ce qui lui permet d'interagir avec Keap1. Keap1 permet l'ubiquitination et la dégradation d'IKK β permettant ainsi de maintenir la voie NF- κ B inhibée (Lee *et al.*, 2009).

En plus de son interaction avec IKK β , Keap1 est capable d'interagir avec **la sous-unité p65 de NF- κ B** *in vitro* et *in vivo* (Yu *et al.*, 2011). La surexpression de p65 dans les cellules HEK293 inhibe la transcription des gènes cibles de Nrf2 induite par le Diéthylmaléate (DEM) et le

tBHQ, tandis que l'inhibition d'IKK β par l'inhibiteur pharmacologique Bay11-7082 rétablit la transcription de ces gènes cibles. La surexpression de p65 diminue la liaison de Nrf2 aux séquences ARE et augmente la forme ubiquitinylée de Nrf2 (Yu *et al.*, 2011).

Par ailleurs, Keap1 a d'autres substrats tels que la phosphatase mitochondriale **Phosphoglycérate mutase 5 (PGAM5)**. L'interaction de Keap1 avec le domaine N-terminal de PGAM5 favorise l'ubiquitination et la dégradation de PGAM5 par le protéasome (Lo and Hannink, 2006). Le domaine C-terminal de PGAM5 interagit avec la protéine anti-apoptotique Bcl-xl. Keap1 permet la dégradation de Bcl-xl en formant un complexe avec PGAM5 (Suryakant K. Niture and Jaiswal, 2011). De plus, le domaine DGR de Keap1 peut également interagir avec le domaine BH2 d'une autre protéine anti-apoptotique : Bcl-2. Keap1 permet l'ubiquitination et la dégradation de Bcl-2 par le protéasome (S K Niture and Jaiswal, 2011). Les antioxydants tels que le tBHQ inhibent l'interaction de Keap1 et de Bcl-2 et stoppent la dégradation de Bcl-2, favorisant ainsi la survie cellulaire. D'autre part, certaines mutations sur Keap1 dans le cancer du poumon empêchent son interaction avec Bcl-2, favorisant ainsi la survie des cellules cancéreuses (S K Niture and Jaiswal, 2011).

Des études de spectrométrie de masse sur des molécules de Keap1 immuno-purifiées ont identifié la protéine **séquestosome 1 (SQSTM1)** comme nouveau partenaire de Keap1 (Ian M Copple *et al.*, 2010). SQSTM1 permet le transport des protéines polyubiquitinées vers une dégradation protéasomale ou lysosomale. La surexpression de SQSTM1 entraîne une diminution de l'expression de Keap1, tandis que l'inactivation de SQSTM1 par siRNA conduit à une augmentation de la demi-vie de Keap1 concomitante avec une diminution de l'expression protéique de Nrf2 (Ian M Copple *et al.*, 2010).

Enfin, des études plus récentes mettent en avant l'interaction de Keap1 avec **la protéine p62**, substrat pour l'autophagie. Le domaine Kelch de Keap1 interagit avec le domaine KIR de p62 et l'utilisation d'un modèle murin invalidé pour le gène *p62* dans le foie a mis en évidence que p62, en interagissant avec le domaine DGR de Keap1 (domaine de liaison à Nrf2), permet la stabilisation de Nrf2 en inhibant sa dégradation (Komatsu *et al.*, 2010). L'interaction de p62 avec Keap1 va conduire à la dégradation de Keap1 par autophagie (Ichimura *et al.*, 2013). De plus Nrf2 régule positivement p62, suggérant un rétrocontrôle positif (Jain *et al.*, 2010).

5.6.5. Les protéines partenaires de Nrf2

La protéine p21^{cip1/WAF1} est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la différenciation cellulaire, la sénescence et la réplication et réparation de l'ADN. En cas de stress oxydant, l'expression de p21 est augmentée pour promouvoir la survie cellulaire. L'action antioxydante de p21 passe par la stabilisation de Nrf2. Le domaine C-terminal de p21 peut interagir avec le motif DLG de Nrf2, empêchant ainsi son interaction avec Keap1 et donc sa dégradation (W. Chen *et al.*, 2009). Des cellules cancéreuses HCT116 transfectées avec des siRNA p21 puis stimulées avec du tBHQ ou du sulforaphane expriment de plus faibles quantités protéiques de Nrf2 et de l'ARNm des gènes cibles *nqo-1*, *gpx2* et *mrp2*, suggérant que p21 participe à la stabilisation de Nrf2 (W. Chen *et al.*, 2009).

La cavéoline-1 (cav-1), protéine retrouvée dans les invaginations de la membrane plasmique riches en lipides appelées cavéoles, a récemment été identifiée comme un partenaire de Nrf2 (Li *et al.*, 2012). Nrf2 contient un domaine de liaison à la cavéoline entre ses domaines Neh5 et Neh6, et interagit constitutivement avec Cav-1 dans le noyau et dans le cytosol (Volonte *et al.*, 2013). L'invalidation de *cav-1* par siRNA dans des cellules épithéliales bronchiques Beas-2B stimulées par du 4-HNE induit une plus forte expression protéique de HO-1, NQO-1 et GCLC et par conséquent une meilleure réponse au stress oxydant. De plus, l'invalidation de *cav-1* dissocie Nrf2 de Keap1 et augmente l'activité transcriptionnelle de Nrf2. La surexpression de Cav-1 diminue l'expression de HO-1, NQO-1 et GCLC et augmente la mort cellulaire en réponse au stress oxydant, confirmant l'effet inhibiteur de Cav-1 sur la voie Nrf2. La stimulation au 4-HNE dissocie Cav-1 de Nrf2 dans le noyau (Li *et al.*, 2012).

La protéine DJ-1 ou parkinson protein 7 (PARK7), ayant un rôle antioxydant, est impliquée dans l'apparition de cancers (Raniga *et al.*, 2014), de maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson (Ariga *et al.*, 2013) et de maladies inflammatoires comme la BPCO (Malhotra *et al.*, 2008). L'invalidation de *dj-1* par siRNA dans des cellules épithéliales de cornée entraîne une diminution de la localisation nucléaire de Nrf2, de l'expression de HO-1 et NQO-1 en réponse aux UVA, et par conséquent une augmentation de la production d'ERO (C. Liu *et al.*, 2014). Il a été montré que DJ-1 est défectueux dans la BPCO. DJ-1 est oxydé en réponse au stress oxydant produit par la fumée de cigarette, entraînant un changement de sa conformation et sa dégradation par le protéasome. La diminution de l'expression de DJ-1 conduit à une diminution de l'expression de Nrf2 et à une défense

antioxydante défectueuse (Malhotra *et al.*, 2008). Par ailleurs, la forme oxydée inactive de DJ-1 est fortement retrouvée dans les neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et de Parkinson. L'excès de stress oxydant généré lors des maladies neurodégénératives oxyde DJ-1, et tout particulièrement la Cys106, le rendant inactif (Ariga *et al.*, 2013). L'invalidation de *dj-1* par siRNA dans la lignée cellulaire humaine de neuroblastome SH-SY5Y entraîne une diminution de l'expression génique et protéique de la Trx1, régulée par Nrf2, en réponse au peroxyde d'hydrogène. En parallèle, la surexpression de DJ-1 entraîne une augmentation de l'expression de Nrf2. L'invalidation de *nrf2* par siRNA inhibe l'induction de Trx1 médiée par DJ-1 en réponse au peroxyde d'hydrogène, suggérant que DJ-1 exerce son effet anti-oxydant *via* Nrf2 (Im *et al.*, 2012).

6. Nrf2 & pathologies inflammatoires

Les souris invalidées pour le gène *nrf2* développent des maladies auto-immunes, comme un syndrome lupique, et des maladies inflammatoires exacerbées telles que les maladies neurodégénératives (Hybertson and Gao, 2014). Depuis plusieurs années, les connaissances quant au rôle de Nrf2 dans la réponse immunitaire ne cessent de croître.

6.1. Rôle de Nrf2 dans l'immunité innée et la réponse inflammatoire

6.1.1. Nrf2 régule les médiateurs de l'inflammation

En réponse à un stress, les cellules de l'immunité innée secrètent diverses **cytokines pro-inflammatoires** telles que le $\text{TNF}\alpha$, l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-12, générant des ERO à leur tour. Ces ERO vont activer le facteur de transcription NF- κ B, entraînant la transcription de cytokines pro-inflammatoires et contribuant ainsi à l'amplification de l'inflammation (Kim *et al.*, 2009). En neutralisant le stress oxydant, la voie Nrf2/Keap1 peut inhiber l'amplification de la réponse inflammatoire. Les souris invalidées pour le gène *nrf2* produisent plus d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-12p40 et de $\text{TNF}\alpha$ comparée aux souris sauvages dans un modèle de colite induit par le sulfate sodique de dextran (Khor *et al.*, 2006). Les activateurs de la voie Nrf2/Keap1 tels que l'auranofine entraînent la diminution d'IL-1 β et de $\text{TNF}\alpha$ dans des macrophages murins exposés à différents signaux de danger comme le LPS (Bondeson and Sundler, 1995). Dans un modèle murin de sclérose multiple, la production de cytokines pro-

inflammatoires IFN γ , IL-1 β , TNF α et IL-12 est augmentée chez les souris invalidées pour le gène *nrf2* et immunisées avec la glycoprotéine myéline-oligodendrocyte (Johnson *et al.*, 2009).

Parmi les enzymes régulées par Nrf2, HO-1 a des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires. La surexpression de HO-1 dans les macrophages leur confère un phénotype M2 régulateur sécrétant de l'IL-10 anti-inflammatoire (Naito *et al.*, 2014).

En réponse à un signal de danger, le système immunitaire inné libère également des **chimiokines**, capables de recruter de nouvelles cellules telles que les PN ou les monocytes pour initier une réponse immunitaire. Les cellules pulmonaires de souris invalidées pour le gène *nrf2* produisent de plus grandes quantités de chimiokines telles que CCL8, CCL2, CCL9, CXCL9, CXCL10 comparé aux souris WT après une injection non létale de LPS (Thimmulappa *et al.*, 2006).

Nrf2 régule par ailleurs l'expression des **molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1**, présentes à la surface des leucocytes et des cellules endothéliales, leur permettant d'accéder au site de l'inflammation. Le prétraitement de cellules endothéliales de veine ombilicale HUVECs par la génistéine, une molécule activatrice de Nrf2, diminue l'expression d'ICAM-1 et VCAM-1 (Zhang *et al.*, 2013). L'invalidation de *nrf2* par siRNA inhibe cet effet, confirmant le rôle anti-inflammatoire de Nrf2 (Zhang *et al.*, 2013). L'expression de ces molécules d'adhésion est également augmentée dans les poumons des souris *nrf2* KO (Thimmulappa *et al.*, 2006).

Une inflammation va générer la synthèse de molécules activatrices de Nrf2 telles que **les prostaglandines** 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 (15 Δ -PGJ2) ou le monoxyde d'azote et ses dérivés. Les prostaglandines 15 Δ -PGJ2 peuvent directement se lier aux cystéines 273 et 288 de Keap1 et de ce fait activer Nrf2 (Takaya *et al.*, 2012). Cox2 est un médiateur inflammatoire permettant la synthèse des prostaglandines. Dans un modèle de colite induit par du sulfate sodique de dextran, l'expression de *cox2* est augmentée chez les souris invalidées pour le gène *nrf2* en comparaison avec les souris sauvages (Khor *et al.*, 2006). Cependant, Cox2 génère également des molécules électrophiles oxydées (EFOX) aux

propriétés anti-inflammatoires capables de se lier aux séquences ARE et aux cystéines de Keap1 activant par conséquent la voie Nrf2 (Luo *et al.*, 2011).

6.1.2. Interactions entre Nrf2 et les voies de signalisation de l'inflammation

Les ERO intracellulaires ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $ONOO^-$) jouent un rôle important dans la réponse inflammatoire car elles activent les MAPK (p38, ERK, JNK) et PI3K qui contrôlent l'activation des facteurs de transcriptions AP-1 et NF- κ B (J. Kim *et al.*, 2010).

Les gènes pro-inflammatoires connus pour être régulés par NF- κ B, tels que l'*il-6* et le *tnf α* , sont plus fortement exprimés chez les souris *nrf2*^{-/-} en réponse au LPS par comparaison avec les souris sauvages (Thimmulappa *et al.*, 2006). De plus, l'invalidation de *nrf2* par siRNA dans des cellules mésangiales murines exacerbe la phosphorylation de p65 et donc l'activation de NF- κ B, soulignant le rôle inhibiteur de Nrf2 sur NF- κ B (Jiang *et al.*, 2014). Ceci s'explique par le contrôle négatif de Nrf2 sur NF- κ B (cf la partie III.5.4.6.).

Le facteur de transcription AP-1 est également impliqué dans la régulation de gènes de l'inflammation comme le *tnf α* (Newton and Dixit, 2012). Certains activateurs de Nrf2, tels que le sulforaphane et 15 Δ -PgJ2 inhibent AP-1 (J. Kim *et al.*, 2010). Ainsi, le sulforaphane diminue la liaison d'AP-1 à l'ADN dans des kératinocytes exposés aux UVB (Zhu *et al.*, 2004). Les prostaglandines 15 Δ -PgJ2 interagissent avec les cystéines de c-Jun, modifiant directement le domaine de liaison d'AP-1 à l'ADN et empêchant la transcription de ses gènes cibles pro-inflammatoires (Na and Surh, 2006).

Nrf2 active par ailleurs l'expression d'*atf3* via la fixation aux séquences ARE de son promoteur (Hoetzenecker *et al.*, 2011). ATF3 inhibe l'expression de gènes pro-inflammatoires tels que l'*il-6*, exerçant ainsi un effet anti-inflammatoire Nrf2-dépendant (Kobayashi *et al.*, 2013).

Cependant, Nrf2 ne joue pas seulement un rôle anti-inflammatoire. En effet, Nrf2 participe à l'activation de l'inflammasome, conduisant à la production d'IL-1 β via l'activation de la caspase-1, et de ce fait a un rôle pro-inflammatoire. Contrairement aux études précédentes qui décrivent une régulation négative de l'IL-1 par Nrf2, les macrophages issus de souris invalidées pour le gène *nrf2* prétraités par le LPS et stimulés par l'alum, activateur de NLRP3, produisent de plus faibles quantités d'IL-1 β que les macrophages issus de souris sauvages (Zhao *et al.*, 2014). De même, les macrophages issus de souris *nrf2*^{-/-} prétraités par le LPS et

stimulés avec l'acide sodique polydeoxyadenylic-deoxythymidylic (poly(dA : dT)), activateur d'AIM2, produisent moins d'IL-1 β . Ces résultats suggèrent que Nrf2 participe à l'activation des inflammasomes NLRP3 et AIM2. De plus, la pro-caspase 1 et la pro-IL-1 β ne sont pas clivées en formes actives dans les macrophages issus de souris *nrf2*^{-/-} prétraités avec le LPS et stimulés avec l'alum et le poly(dA : dT), contrairement aux macrophages issus de souris *nrf2*^{+/+}. Nrf2 est donc indispensable à l'activation des inflammasomes NLRP3 et AIM2. *In fine*, Nrf2 est requis pour la formation du complexe protéique ASC, indispensable à l'activation de la caspase-1 (Zhao *et al.*, 2014). Enfin, l'injection intrapéritonéale d'alum, provoquant une péritonite, entraîne une production significativement diminuée d'IL-1 β dans la cavité péritonéale des souris *nrf2*^{-/-} par rapport aux souris *nrf2*^{+/+}, confirmant le rôle pro-inflammatoire de Nrf2 *in vivo* (Zhao *et al.*, 2014).

6.1.3. Nrf2 et maladies inflammatoires

Des mutations dans le gène *nrf2* ont été identifiées dans de nombreuses pathologies à composante inflammatoire telles que les maladies auto-immunes, l'asthme, l'emphysème, l'inflammation cérébrale, la colite (Hybertson and Gao, 2014).

L'emphysème pulmonaire est caractérisé par une rupture de l'architecture alvéolaire, une destruction des parois alvéolaires avec un élargissement des espaces alvéolaires. Les cellules inflammatoires telles que les macrophages et les polynucléaires neutrophiles s'accumulent dans les voies aériennes et le parenchyme pulmonaire. Goven *et al.* ont réalisé une étude clinique chez des patients atteints d'emphysème pulmonaire post-tabagique et ont pu mettre en évidence une diminution de l'accumulation nucléaire de Nrf2 dans les macrophages alvéolaires, associée à une diminution de l'expression génique des enzymes antioxydantes telles que *ho-1*, *gpx2*, *nqo1*. La diminution de l'expression de Nrf2 est corrélée à la sévérité de la pathologie (Goven *et al.*, 2008). Le traitement de fibroblastes de patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique ou de sujets témoins par du sulforaphane a un effet antifibrotique en diminuant l'expression du collagène I et de l' α -actine, deux protéines pro-fibrosantes, ainsi qu'un effet antioxydant (Artaud-Macari *et al.*, 2012). Ces effets sont absents dans les cellules transfectées par des siRNA Nrf2, démontrant ainsi leur dépendance de Nrf2 (Artaud-Macari *et al.*, 2012).

Le KGF (Keratinocyte Growth Factor) est impliqué dans la survie des cellules épithéliales et la **réparation tissulaire cutanée** en régulant l'inflammation. Le KGF active l'expression génique de *nrf2*, mettant ainsi en évidence le rôle de Nrf2 dans la cicatrisation des plaies (Braun *et al.*, 2002). Nrf2 est fortement exprimé dans les kératinocytes de l'épithélium lésé, et en l'absence de Nrf2, l'infiltrat de macrophages persiste durant la cicatrisation, ce qui prolonge l'état inflammatoire. L'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF α produites par les neutrophiles et les macrophages est fortement diminuée chez des souris WT blessées contrairement aux souris *nrf2*^{-/-} (Braun *et al.*, 2002).

Par ailleurs, l'utilisation de souris transgéniques exprimant constitutivement Nrf2 (caNrf2) dans les KC a montré que Nrf2 protège des effets délétères des rayons UVB. Nrf2 protège les kératinocytes de l'apoptose en détoxifiant les ERO induites par les UVB (Schäfer *et al.*, 2010). De plus, les souris *nrf2*^{-/-} exposées aux rayons UVB développent une inflammation cutanée plus importante que celle observée chez les souris *nrf2*^{+/+}. Cette inflammation se caractérise par un épaissement important de la peau après exposition aux rayons UVB (Saw *et al.*, 2011). L'expression de la MMP-9 est plus importante chez les souris *nrf2*^{-/-} que chez les souris *nrf2*^{+/+} exposées aux UVB, entraînant une destruction de la MEC plus importante. L'irradiation aux UVB entraîne également l'expression de p53, protéine de réparation de l'ADN, plus importantes chez les souris *nrf2*^{-/-} que chez les souris *nrf2*^{+/+}, suggérant que les dommages à l'ADN induits par les UVB sont plus importants chez les souris *nrf2*^{-/-} (Saw *et al.*, 2014). Enfin, Nrf2 assure une protection cellulaire en réponse aux rayons UVA dans un modèle de KC humains HaCat. L'invalidation de Nrf2 par siRNA entraîne une perte de l'intégrité membranaire et une augmentation de l'apoptose des cellules HaCat exposées aux rayons UVA (Tian *et al.*, 2011).

Un stress oxydant excessif est associé à la mort neuronale durant la pathogénèse de nombreuses **maladies dégénératives** telles que la Maladie de Parkinson (MP) et la Maladie d'Alzheimer (MA) (Gao *et al.*, 2014). Plusieurs études mettent en avant la pertinence de Nrf2 dans la protection neuronale. L'excès de stress oxydant est une des premières manifestations de la MA, qui précède les dépôts amyloïdes et la dégénérescence neurofibrillaire (Clark *et al.*, 2010). Par immunohistochimie, une étude post-mortem sur des cerveaux de patients atteints de la MA a révélé que Nrf2 prédomine dans le cytoplasme des neurones de l'hippocampe et des astrocytes, tandis qu'il est faiblement exprimé dans les

noyaux. Cependant, l'expression cytoplasmique de Nrf2 est identique chez les patients et chez les témoins. De plus, Nrf2 est faiblement exprimé dans les plaques amyloïdes et les enchevêtrements neurofibrillaires (Ramsey *et al.*, 2007). Ainsi, la translocation nucléaire de Nrf2 semble être bloquée, empêchant Nrf2 d'être fonctionnel chez les patients atteints de la MA.

Le gène *dj-1* est altéré dans les formes familiales de MP, entraînant une instabilité de Nrf2 et par conséquent sa dégradation excessive (Dias *et al.*, 2013). Dans un modèle murin de MP induit par le 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), l'activation de Nrf2 par l'administration de triterpénoïdes synthétiques réduit l'inflammation et le stress oxydant dans le cerveau en permettant l'expression des gènes et protéines cytoprotecteurs et la régénération du GSH (Kaidery *et al.*, 2012). Le traitement de souris invalidées pour le gène *nrf2* n'a aucun effet, confirmant ainsi le rôle bénéfique de Nrf2 dans la neuroprotection (Kaidery *et al.*, 2012).

Enfin, Nrf2 est reconnu comme une protéine bénéfique protégeant l'organisme contre les substances génotoxiques : plusieurs études *in vivo* ont montré que les souris *nrf2*^{-/-} ont une sensibilité accrue aux toxiques et aux agents carcinogènes et sont réfractaires à l'action protectrice des composés chemopréventifs (Ramos-Gomez *et al.*, 2001). Cependant, en promouvant la survie des cellules cancéreuses et la résistance aux chimiothérapies, Nrf2 a un rôle délétère appelé 'dark side' (X. J. Wang *et al.*, 2008). Des mutations de Keap1 telles que C23Y dans le cancer du sein, entraînent son incapacité à inhiber Nrf2 (Nioi and Nguyen, 2007). Des mutations de Cul3 et de Nrf2 ont également été identifiées et ne permettent plus la dégradation de Nrf2, lui conférant un état d'hyperactivation favorisant l'émergence de cancers tels que le carcinome papillaire rénal (Ooi *et al.*, 2013).

Bien que Nrf2 module la réponse immunitaire dans de nombreux modèles d'inflammation chez l'animal, ses effets sur la réponse immunitaire adaptative sont encore mal caractérisés.

6.2. Nrf2 dans la réponse immunitaire adaptative

Les lymphocytes T sont des cellules cruciales dans la génération d'une réponse immunitaire adaptative. Comme décrit dans la partie II, leur activation est possible grâce à leur interaction avec les cellules dendritiques.

6.2.1. Implication de Nrf2 dans la production de cytokines clés dans l'orientation d'une réponse immunitaire par la DC

Le traitement des BMDC par du sulforaphane inhibe la production d'IL-12, cytokine orientant une réponse Th1, et d'IL-23, cytokine orientant une réponse Th17, en réponse au LPS. Par conséquent, l'orientation Th1 et Th17 des LT issus de souris OT-II cultivés avec des BMDC traitées par le sulforaphane est supprimée (Geisel *et al.*, 2014). L'effet inhibiteur du sulforaphane est médié par l'induction d'HO-1 qui inhibe l'activation de NF- κ B. En interagissant avec sa sous-unité p65, HO-1 inhibe ainsi la transcription des gènes cibles de NF- κ B tels que *il-12* et *il-23* (Geisel *et al.*, 2014).

Des activateurs de Nrf2 tels que l'arsenic (As) et le tBHQ diminuent la production de l'IL-12p70 ainsi que de l'IL-23 dans des MoDCs en réponse au LPS (Macoch *et al.*, 2015). L'inactivation de Nrf2 par siRNA inhibe l'effet immunosuppresseur de l'As, suggérant que l'inhibition de la production d'IL-12 et d'IL-23 est médiée par Nrf2. De plus, l'As inhibe l'expression génique de l'*il-12* dans des DC issues de souris *nrf2*^{+/+} (BMDCs *nrf2*^{+/+}) en réponse au LPS mais pas dans les BMDCs *nrf2*^{-/-} (Macoch *et al.*, 2015).

L'homéostasie redox, fortement régulée par le GSH, est impliquée dans l'expression des récepteurs de co-stimulation à la surface des DC. Les BMDC *nrf2*^{-/-} ont des taux plus faibles de GSH et expriment plus fortement les marqueurs de co-stimulation tels que CD86 et CD40 (Yeang *et al.*, 2012). De plus, les BMDC *nrf2*^{-/-} ont une capacité d'endocytose altérée et activent plus fortement les LT CD8⁺ que les BMDC *nrf2*^{+/+} (Yeang *et al.*, 2012). La stimulation de BMDC *nrf2*^{-/-} par un mélange de particules de pollution de l'air ambiant de Baltimore (APM) entraîne un stress oxydant et une production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF α plus élevée en comparaison avec les BMDC *nrf2*^{+/+} (Williams *et al.*, 2008). Des co-cultures de BMDC exposées aux APM et de cellules OT-II CD4⁺ naïves ont montré que l'absence de Nrf2 dans les BMDCs oriente les cellules CD4⁺ vers une réponse Th2 (Williams *et al.*, 2008).

Enfin, l'inhibition d'HO-1 par de l'étain protoporphyrine dans les BMDC augmente la capacité de ces DC à stimuler les LT CD8⁺, soulignant le rôle régulateur d'HO-1 dans la réponse immunitaire (Al-Huseini *et al.*, 2014).

6.2.2. Implication de Nrf2 dans l'activation des LT et la sécrétion de cytokines par les lymphocytes T

Le tBHQ active Nrf2 dans les cellules T isolées à partir de ganglions ou de rate de souris, diminuant la production d'IFN γ au profit de la production des cytokines Th2 : IL-4, IL-5 et IL-13 (Rockwell *et al.*, 2012). De plus, l'activation de Nrf2 inhibe la liaison du facteur de transcription t-bet à l'ADN, décrit pour induire une réponse Th1, tandis qu'il favorise la liaison du facteur de transcription GATA-3, décrit pour induire une réponse Th2 (Rockwell *et al.*, 2012).

Le traitement de LT CD4⁺ isolés à partir de PBMCs humains avec du tBHQ diminue la production des cytokines IL-2 et IFN γ ainsi que les marqueurs d'activation CD25 et CD69 en réponse à une stimulation par un anti-CD3/anti-CD28 (Turley *et al.*, 2015). Ceci suggère que l'activation de Nrf2 par le tBHQ inhibe l'activation des LT.

Cependant, l'effet de Nrf2 sur la sécrétion de cytokines par les LT est controversé. Contrairement à Turley et collaborateurs, Morzadec *et al.* montrent que l'inhibition de Nrf2 dans les lymphocytes T ne module pas leur production de cytokines IL-2, TNF α , IFN γ et IL-17 en réponse à l'arsenic (Morzadec *et al.*, 2014). De plus, le traitement *in vitro* de cellules T par du sulforaphane n'altère pas la sécrétion de plusieurs cytokines en réponse à un anti-CD3 ou à un anti-CD28 : IFN γ , IL-4, IL-17, IL-2 et TNF (Geisel *et al.*, 2014).

Par ailleurs, il a été mis en évidence par PCR que les Treg CD4⁺CD25⁺ expriment constitutivement l'ARNm codant pour *ho-1* (Pae *et al.*, 2003). Les LT CD4⁺CD25⁻ n'expriment pas l'ARNm codant pour *ho-1* à l'état basal. La stimulation de ces LT CD4⁺CD25⁻ par un anti-CD3 combiné à un anti-CD28 induit l'expression de l'ARNm codant pour *ho-1* (Pae *et al.*, 2003). La surexpression d'HO-1 dans les cellules Jurkat par transfection d'un plasmide inhibe la prolifération des cellules. Cette prolifération est rétablie lorsqu'HO-1 est inhibé par du zinc protoporphyrin, suggérant qu'HO-1 a un effet anti prolifératif dans les LT (Pae *et al.*, 2003). L'induction d'HO-1 par du cobalt protoporphyrine dans les LT CD4⁺ inhibe la prolifération induite par un anticorps anti-CD3/CD28 (Pae *et al.*, 2004). Les effets régulateurs de HO-1

sont médiés par le monoxyde de carbone (CO) généré au cours du catabolisme de l'hème par HO-1 (Pae *et al.*, 2004). Le CO inhibe l'entrée des LT CD4⁺ dans le cycle cellulaire et la production d'IL-2, permettant ainsi l'effet immuno-suppresseur d'HO-1 (Pae *et al.*, 2004) et le maintien de la tolérance périphérique par les Treg CD4⁺CD25⁺ (Brusko *et al.*, 2005). Les splénocytes issus de souris invalidées pour le gène *ho-1* stimulés par du LPS ou un anticorps antiCD3/CD28 produisent de beaucoup plus fortes quantités de cytokines pro-inflammatoires TNF α , IFN γ , IL-6, IL-2, IL-1 en comparaison avec les splénocytes issus de souris sauvages (Kapturczak *et al.*, 2004).

6.2.3. Implication de Nrf2 dans l'inflammation cutanée d'origine allergique

Les molécules allergisantes cutanées telles que le DNCB induisent une réponse allergique mesurée par le test MEST (décrit juste avant le chapitre II.2), plus importante chez les souris *nrf2*^{-/-} que chez les *nrf2*^{+/+}, montrant que Nrf2 contrôle l'inflammation d'origine allergique (El Ali *et al.*, 2013). De plus, des concentrations de DNCB n'entraînant pas d'inflammation cutanée chez la souris *nrf2*^{+/+} entraînent une augmentation de l'épaisseur des oreilles caractéristique d'une inflammation chez la souris *nrf2*^{-/-}. Le seuil de l'inflammation cutanée d'origine allergique est donc plus bas chez la souris *nrf2*^{-/-}. Ainsi, l'activation de Nrf2 par les allergisants de contact pourrait contrôler et limiter la réponse inflammatoire générée au cours de l'EAC (El Ali *et al.*, 2013).

Le local lymph node assay (LLNA) permet de mesurer la phase de sensibilisation d'une HSC en mesurant la prolifération lymphocytaire chez des souris sensibilisées au niveau auriculaire par une molécule allergisante une fois par jour, pendant 3 jours consécutifs. La mesure est effectuée 5 jours après la première exposition en injectant de la thymidine tritiée par voie intraveineuse. Le DNCB et le CinA induisent une plus forte augmentation de la prolifération lymphocytaire chez les souris *nrf2*^{-/-} par comparaison avec les souris *nrf2*^{+/+}. Ceci montre que Nrf2 contrôle la prolifération lymphocytaire en réponse aux molécules allergisantes lors de la phase de sensibilisation (El Ali *et al.*, 2013).

Par ailleurs, HO-1 intervient dans la résolution de l'inflammation médiée par les LT (Pae *et al.*, 2008). En effet, dans un modèle d'HSC, le gonflement des oreilles et l'infiltrat cellulaire auriculaire induit par le DNFB diminue significativement en présence d'un traitement topique des souris avec le cobalt protoporphyrine IX, inducteur d'HO-1. Le gonflement et

l'infiltrat cellulaire auriculaires sont majorés lorsque HO-1 est inhibé par l'étain protoporphyrin IX, inhibiteur d'HO-1 (Pae *et al.*, 2008).

Ainsi, Nrf2, en régulant des gènes cibles clés comme *ho-1* dans les cellules de l'immunité telles que les DC et les LT, peut moduler la réponse immunitaire et notamment la réponse inflammatoire d'origine allergique.

Les nouvelles directives européennes n'autorisant plus l'expérimentation animale pour le développement des produits cosmétiques, les tests *in vitro* doivent être suffisamment sensibles et performants pour détecter le potentiel allergisant des molécules chimiques.

A ce jour, quatre méthodes *in vitro*, actuellement en pré-validation ou validés par l'ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) ont été développées pour mesurer le pouvoir sensibilisant cutané des molécules chimiques. Le test du Direct Reactivity Peptide Assay (DPRA) permet d'évaluer la réactivité chimique des molécules envers les cystéines et les lysines (Gerberick *et al.*, 2007). Ceci permet d'estimer la capacité de ces molécules électrophiles à lier les groupements nucléophiles des protéines pour générer un complexe immunogène. Le KeratinoSens intègre la capacité d'une molécule à induire l'activité transcriptionnelle de gènes dont le promoteur possède des séquences ARE (Natsch and Emter, 2008; Natsch, 2009). Enfin, deux tests prennent en considération la capacité des haptènes à induire l'activation des DC : le test Myeloid U937 Skin Sensitization (MUSST) mesure l'augmentation du CD86 à la surface des cellules U937 et le test Human-Cell Line Activation (HCLAT) mesure l'expression de CD86 et CD54 des cellules THP1 en réponse à la molécule chimique (Aeby *et al.*, 2010).

Plus récemment, l'équipe d'Hervé Groux, du groupe ImmunoSearch, a réalisé l'analyse de gènes modulés durant la sensibilisation murine et humaine. Cela a permis l'identification de 200 gènes impliqués dans le processus de sensibilisation cutanée (Cottrez *et al.*, 2015). La modulation de ces 200 gènes a été étudiée dans un modèle d'épiderme humain reconstruit (Episkin) exposé durant 6h à vingt molécules sensibilisantes et vingt autres molécules non sensibilisantes. Il apparaît que les molécules sensibilisantes activent tout particulièrement un panel de gènes appelé « redox/detox », désignant les gènes ARE-dépendants. Parmi eux, la *sod*, la *gpx*, la *gcs*, la *trx*, la *gst* et la *nqo1* sont tous des gènes ARE-dépendants activés durant

le processus de sensibilisation et font partie des gènes Redox/detox proposés parmi les biomarqueurs de sensibilisation (Cottrez *et al.*, 2015).

Sur les 20 sensibilisants testés, 15 activent plus de 10 gènes de ce panel, tandis que seulement 4 molécules non-sensibilisantes sur 20 testées activent les gènes de ce panel (Cottrez *et al.*, 2015). L'activation des gènes ARE-dépendants ainsi que d'autres gènes appelés « SENS-IS » regroupant des gènes de réparation tissulaires et de l'inflammation pourrait s'inscrire dans un test *in vitro* de détection du potentiel sensibilisant des molécules chimiques (Cottrez *et al.*, 2015).

PRESENTATION DU TRAVAIL

Présentation du travail

Au sein des DC, la voie des MAPK et la voie NF- κ B contrôlent l'acquisition d'un phénotype mature en réponse aux molécules allergisantes. Afin d'identifier de nouvelles voies de signalisation originales activées par les haptènes, un peptide array a été réalisé par le Dr Philippe Rousseau dans notre équipe et a permis de mettre en évidence l'activation de la protéine kinase CK2 par les trois molécules allergisantes testées : DNCB, CinA et NiSO₄. La CK2 est une kinase ubiquitaire et constitutivement active, et jusqu'à ce jour, aucune étude n'avait décrit le rôle de cette kinase dans la DC.

Le premier objectif de ce travail a été d'étudier le rôle de la protéine kinase CK2 dans l'activation des DC et la réponse lymphocytaire T en réponse aux molécules allergisantes. Pour cela, nous avons utilisé des DC différenciées à partir de monocytes humains (MoDC) qui ont été stimulées par deux molécules allergisantes : le NiSO₄ et le DNCB. Nous montrons que l'activité de la CK2 dans la DC est importante dans l'acquisition d'un phénotype mature et la production de cytokines pro-inflammatoires clés pour l'orientation d'une réponse lymphocytaire en réponse au DNCB et au NiSO₄. Par ailleurs, l'activité de la CK2 dans les MoDC contrôle l'orientation d'une réponse Th1 en réponse au DNCB et au NiSO₄ et inhibe l'émergence d'une réponse Th2 à l'état basal.

Le facteur de transcription Nrf2 joue un rôle majeur dans la lutte contre le stress chimique induit par les molécules allergisantes et contrôle l'inflammation d'origine allergique. Nrf2 permet la transcription d'un large panel de gènes impliqués dans la détoxification des xénobiotiques, la protection et la survie cellulaire. De plus, des données internes à notre équipe montrent que la présence de Nrf2 dans les DC joue un rôle primordial dans la régulation de la réponse immunitaire en réponse aux molécules allergisantes.

Le deuxième objectif de ce travail a été d'étudier le rôle des voies de signalisation activées par les molécules allergisantes dans l'activation du facteur de transcription Nrf2. Par ailleurs, ce travail cherche à identifier les partenaires transcriptionnels de Nrf2 en réponse aux molécules allergisantes. Pour ce faire, nous avons utilisé la lignée cellulaire THP1, lignée pro-monocytaire utilisée dans le test human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Le h-CLAT a été validé par le centre européen de validation des méthodes alternatives (ECVAM) pour

détecter le potentiel allergisant des composés chimiques *via* la mesure de l'induction de deux marqueurs d'activation de la DC, CD86 et CD54.

Nous montrons par Western blot que Nrf2 existe sous une forme phosphorylée. Dans le but d'identifier les kinases responsables de cette phosphorylation, nous avons eu une approche par des inhibiteurs pharmacologiques. Nous avons identifié la CK2 comme contrôlant l'expression des gènes cibles de Nrf2 sans toutefois être directement impliquée dans la stabilisation de Nrf2. Contrairement au SP600125, l'inhibiteur pharmacologique de JNK, l'inhibition spécifique de JNK par siRNA n'altère pas l'activation de Nrf2. Le SP600125, n'est pas spécifique de JNK et inhibe l'activité de la CK2. Ceci suggère que l'inhibition de Nrf2 que nous avons observé avec le SP600125 dépend de l'inhibition d'autres kinases telles que la CK2. Toutefois, nous avons montré que c-Jun, substrat majeur de JNK, pourrait être un partenaire transcriptionnel de Nrf2 : c-Jun se fixe aux séquences ARE en réponse au CinA et interagit avec Nrf2 en réponse au DNCB.

Cette étude souligne donc la complexité des mécanismes qui conduisent à l'activation de Nrf2. Chaque molécule semble activer une voie qui lui est spécifique, et mener à un complexe transcriptionnel dépendant du signal initial.

RESULTATS

ARTICLE

Protein kinase CK2 controls T cell polarization through dendritic cells activation in response to contact sensitizers

Submitted in Journal of Immunology (JI)

Marie de Bourayne, Yann Gallais, Zeina El Ali, Philippe Rousseau, Marie-Hélène Damiens, Claude Cochet, Odile Filhol, Sylvie Chollet-Martin, Marc Pallardy, Saadia Kerdine-Römer

L'eczéma allergique de contact est une réaction d'hypersensibilité retardée qui touche 15 à 20% de la population européenne. Il s'agit d'une réaction inflammatoire aiguë qui survient suite à l'exposition répétée de la peau avec une molécule allergisante. Les composés chimiques responsables d'HSC sont majoritairement des haptènes, molécules de faible poids moléculaire, qui ne deviennent immunogènes qu'après association stable avec des protéines de l'environnement cutané. Les DC jouent un rôle essentiel dans la première phase de l'EAC appelée phase de sensibilisation, cliniquement muette. Les DC capturent le complexe haptène-protéine pour le présenter aux lymphocytes T naïfs et générer une réponse T effectrice CD8⁺ Tc1/Tc17 and CD4⁺ Th1/Th17. Pendant la phase d'élicitation qui se déroule lors d'une réexposition au même haptène, ces LT déclenchent le processus inflammatoire responsable des lésions cutanées caractéristiques de l'eczéma.

L'acquisition d'un phénotype mature par les DC en réponse aux molécules allergisantes est contrôlée par la voie des MAPK et la voie NF- κ B. Afin d'identifier d'autres voies de signalisation originales impliquées dans l'activation des DC en réponse à ces molécules, un peptide array a été réalisé et a mis en évidence l'importance de la protéine kinase CK2.

Le rôle de la CK2 dans l'activation des DC isolées à partir de monocytes humains circulants (MoDC) en réponse aux molécules allergisantes a été ainsi adressé. Pour ce faire, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de l'activité de la CK2, le CX-4945. Nous avons étudié les conséquences de l'inhibition de l'activité de la CK2 sur différentes fonctions de la DC en réponse à deux molécules allergisantes, le DNCB et le NiSO₄. Tandis que la capacité d'endocytose des DC n'est pas affectée, le traitement des MoDC par le CX-4945 conduit à une altération de l'acquisition d'un phénotype membranaire et cytokinique. En effet, il apparaît que la CK2 contrôle l'expression du CD54 et de PDL-1 en réponse aux deux molécules, l'expression de CD86 en réponse au NiSO₄ et l'expression de CD40 en réponse au

DNCB. De plus, en réponse au NiSO_4 , l'inhibition de l'activité de la CK2 induit une forte augmentation de deux cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la polarisation lymphocytaire T : IL-23 et IL-1 β .

Nous avons donc investigué quelles en étaient les conséquences sur l'activation des LT. Nous montrons que la CK2 est indispensable aux DC pour activer la prolifération des LT CD4^+ en réponse au DNCB, et régule la polarisation Th1 en contrôlant la production d'IFN γ par les LT. En revanche, sans être indispensable à l'activation de la prolifération des LT en réponse au NiSO_4 , l'activité de la CK2 dans les DC régule également la polarisation Th1 en contrôlant la production d'IFN γ . De plus, cette étude confirme que l'activité de la CK2 inhibe la polarisation des lymphocytes Th2 à l'état basal et ce, *via* la DC.

Enfin, nous avons mis en évidence que la CK2 contrôle l'expression génique de divers facteurs de transcription de la famille des IRF, connus pour orienter la réponse lymphocytaire T.

En résumé, ce travail montre pour la première fois que la CK2 est nécessaire à la DC d'une part pour l'acquisition d'un phénotype mature, et d'autre part, pour polariser une réponse Th1 en contrôlant la production d'IFN γ par les LT.

Title: Protein kinase CK2 controls T cell polarization through dendritic cells activation in response to contact sensitizers

Marie de Bourayne^{*}, Yann Gallais^{*}, Zeina El Ali[†], Philippe Rousseau[‡], Marie-Hélène Damiens^{*}, Claude Cochet[§], Odile Filhol[§], Sylvie Chollet-Martin^{*}, Marc Pallardy^{*}, Saadia Kerdine-Römer^{*}

^{*}Universud, INSERM UMR-S 996 ‘Inflammation, Chemokines and Immunopathology’, Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, 92296 Châtenay-Malabry, France

[†] Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB), Faculté de Médecine, Université Paris-Est, Créteil – France & UPEC, IMRB, INSERM UMR-S 955, Team 12, Créteil, France

[‡]Bloomfield Center for Research in Aging, Lady Davis Institute for Medical Research, Jewish General Hospital, Montréal, Québec H3T 1E2, Canada

[§]INSERM UMR 1036, Cancer and Infection Biology, iRTSV, CEA Grenoble, F-38054, France.

Short title: CK2, a key kinase in DCs activation in response to contact sensitizers

Corresponding author: Prof. Saadia Kerdine-Römer, INSERM UMR-996; Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, F-92296 Châtenay-Malabry

Tel: 00 33 (0) 1 4683 5779, Fax: 00 33 (0) 1 4683 5496

E-mail: saadia.kerdine-romer@u-psud.fr

Keywords: Dendritic Cells, CK2, Th1/Th2/Th17 cells, Allergy, Cytokines

Abstract

Allergic contact dermatitis (ACD) represents a severe health problem with increasing worldwide prevalence. It is a T cell-mediated inflammatory skin disease caused by chemicals present in daily or professional environment. Nickel sulfate (NiSO_4) and 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) are two chemicals involved in ACD. These contact sensitizers are known to induce an up-regulation of phenotypic markers and cytokine secretion in dendritic cells (DCs), professional antigen-presenting cells, leading to the generation of CD8^+ Tc1/Tc17 and CD4^+ Th1/Th17 effector T cells.

In the present study, using a peptide array approach, we identify protein kinase CK2 as a new kinase involved in the activation of human monocytes-derived DCs (MoDCs) in response to NiSO_4 and DNCB. Inhibition of CK2 activity in MoDCs leads to an altered mature phenotype with lower expression of CD54, PDL-1, CD86 and CD40 in response to NiSO_4 or DNCB. We also show that CK2 activity regulates pro-inflammatory cytokine production such as $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ and IL-23 in MoDC. Moreover, using a DC/T cell co-culture model in an allogeneic set-up, our work demonstrate that CK2 activity in MoDCs plays a major role in the Th1 polarization in response to NiSO_4 and DNCB. Interestingly, we also demonstrate that CK2 inhibition in MoDCs leads to an enhanced Th2 polarization in the absence of contact sensitizer stimulation.

Introduction

Allergic Contact dermatitis (ACD) is a T-cell mediated inflammatory skin disease caused by type IV delayed hypersensitivity responses to contact allergens (1). Contact allergens are chemically reactive haptens (molecular weight < 500 Da). During skin penetration, they bind to self-proteins to generate immunogenic neo-antigens (2). DCs are the major players of the sensitization phase, the first phase of ACD. This phase is clinically unapparent and occurs at the first contact of skin with the chemical sensitizer and leads to the generation of hapten-specific T cells (3). DCs capture the hapten-self-protein complex, migrate through the lymphatic vessels and present the hapten-protein complex to naive T cells in the draining lymph node to generate CD8⁺ Tc1/Tc17 and CD4⁺ Th1/Th17 effector T cells which enter the blood circulation (3, 4). The second phase of ACD, termed elicitation phase, occurs upon re-exposure of sensitized individuals with the same hapten and is clinically apparent. Specific T lymphocytes are activated in the dermis and the epidermis, and trigger the inflammatory process responsible for the cutaneous lesions (3).

More than 3000 contact allergens have been identified. Nickel, present in jewellery, piercing, coins and smartphone, is a metallic hapten ranked as the number one allergen in term of frequency of positive patch test reactions (5). 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) is used as a reactive intermediate during the manufacture of fungicide, dyes or elastomer. DNCB is used to study the mechanisms of contact sensitivity because it is able to induce ACD in all immunocompetent humans (6). Moreover, DNCB is still the reference product in regulatory tests to measure the potency of sensitization.

Previously, using human *in vitro* DC models, we and others have demonstrated that chemical sensitizers like NiSO₄ induced phenotypic modifications with HLA-DR, CD86, CD40, CD83

and CCR7 up-regulation and secretion of inflammatory cytokines such as IL-8 and TNF α (7–10). Signalling pathways such as Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) and Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) have been reported to be involved in DC maturation in response to contact sensitizers (8, 9, 11, 12). Thus, inhibition of p38 MAPK, c-Jun N-Terminal Kinase (JNK), and Extracellular Regulated Kinase (ERK) abrogate the NiSO₄-induced up-regulation of CD86, CD83, and CCR7 expression. Otherwise, it was demonstrated that p38 MAPK, NF- κ B, and Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1) were involved in IL-12p40 production induced by NiSO₄ (13). In response to DNCB, p38 MAPK controls the expression of HLA-DR, CD86, CD83 and the production of IL-8 by DCs (9). Moreover, p38 MAPK and JNK control TNF- α release in DNCB-stimulated DCs (7).

The hypothesis that chemical sensitizers can be perceived as a danger signal by DCs has been also proposed based on signaling pathways identified upon chemical sensitizer treatment and also known to be triggered by danger signals such as toll-like receptor agonists (7, 8, 12). Signaling pathways such as MAPKs and NF- κ B are known to be redox sensitive, and oxidative stress induced by chemical sensitizers has been shown to participate in the DC-maturation process (for review, see (14)). However, very little is known concerning upstream signals and therefore pathways that could be involved in MAPK and NF- κ B activation. To this extend, we performed a peptide array to find these original pathways implicated in the biological response of DCs to contact sensitizers. Results from this peptide array has highlighted the activation of protein kinase CK2 (formerly casein kinase 2), a multifunctional and pleiotropic protein, ubiquitous and constitutively active. CK2 is a multisubunit protein kinase exhibiting a quaternary structure composed of two catalytic subunits, CK2 α and CK2 α' , and two regulatory subunits CK2 β . As a signalling protein, CK2 is a promiscuous

kinase having many cellular functions associated with a wide repertoire of substrates. Indeed, CK2 has been found to regulate key transcription factors implicated in inflammation and cytokine signalling like NF- κ B and Activator Protein-1 (AP-1) (15).

To investigate the role of CK2 in DCs activation in response to contact sensitizers, we used a highly specific pharmacological inhibitor of CK2, CX-4945. In DCs differentiated from human monocytes (MoDCs), we showed that CK2 plays (1) a role in phenotypic maturation and cytokine production in response to NiSO₄ and DNCB, and (2) a major role in CD4⁺ T lymphocytes activation and in the control of Th1 polarization without affecting Th17 polarization.

Materials and methods

Generation of dendritic cells derived from human monocytes (MoDCs)

The generation of human MoDCs has been performed as previously described (13). Briefly, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are isolated from whole blood of healthy donors obtained from Etablissement Français du Sang (EFS, Rennes, France) by density centrifugation with Ficoll-gradient (lymphocyte separation medium LSM 1077; PAA, Les Mureaux, France). Monocytes are further isolated from the mononuclear fraction through magnetic positive selection using MiniMacs separation columns (Miltenyi Biotec, Bergish Glabash, Germany) and anti-CD14 antibodies coated on magnetic beads following manufacturer's instructions (Direct CD14 isolation kit, Miltenyi Biotec, Bergish Glabash, Germany). These CD14⁺ cells are confirmed to have purity greater than 95%, based on CD14 expression (555398, BD Biosciences) evaluated by flow cytometry (FacsCalibur, BD Biosciences). Monocytes are cultured at 1×10^6 cells/ml in the presence of GM-CSF (550 U/ml) and IL-4 (550 U/ml) (both from Miltenyi Biotec, Bergish Glabash, Germany) in RPMI 1640 medium with Glutamax, 25 mM HEPES (Gibco Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) supplemented with 10 % heat inactivated fetal bovine serum (Biowest, Paris, France), 1% sodium pyruvate (Gibco Invitrogen), 1% penicillin/streptomycin (Gibco Invitrogen) [RPMIc]. Resulting Mo-DCs are DC-SIGN^{high}, CD1a^{high}, CD86^{low} and CD83^{low} as evaluated by flow cytometry (FacsCalibur, BD Biosciences).

Chemical treatment

MoDCs are washed twice and then incubated at 1×10^6 cells/ml. Cells are then treated with 2,4-dinitrochlorobenzene [DNCB (10 μ M), Sigma[®], Saint Louis, USA] or nickel sulfate [NiSO₄ (500 μ M), Sigma[®], Saint Louis, USA] for different period of time according to the

experiments. DNCB is dissolved in DMSO at 0.1% as a final concentration in complete medium whereas NiSO₄ is dissolved in saline. Inhibition of CK2 activity is performed using the pharmacological inhibitor CX-4945 (5 μ M, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany).

Phosphokinome analysis of NiSO₄- and DNCB-stimulated MoDCs

Human MoDCs from 10 healthy donors has been selected for their response to NiSO₄ and DNCB: CD83 and CD86 up-regulation at 24 h by flow cytometry analysis (described below) and activation of phospho-p38 at 30 min evaluated by Western blot.

Immature Mo-DCs (1x10⁶ cells/donor/chemical) are treated with vehicle (DMSO or saline), NiSO₄ (500 μ M) or DNCB (10 μ M) for 30 min and 60 min in culture conditions (37°C, 5% CO₂) and are collected on ice, washed with PBS and resuspended in 25 μ L cold lysis buffer triton 1% (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% triton X-100, 2.5 mM Na₄P₂O₄, 1 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₃, 1 mM NaF, supplemented with Complete[®] (Roche) protease inhibitor cocktail). Cell lysates are pooled by treatment (molecule/time), cleaned by centrifugation, diluted in buffer (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂ supplemented with Complete[®] protease inhibitor cocktail (Roche) and cleaned a second time as above. 80 μ L of supernatant are mixed with 10 μ L of Activation Mix [20 μ Ci of γ ³³P-ATP (GE-Amersham)], 50 % glycerol, 5 mM DTT, 50 mM MgCl₂, 50 mM MnCl₂, 250 μ g/mL PEG 8000, 250 μ g/mL BSA), cleared by an additional centrifugation, loaded on one PepChip Kinomics Array (Pepscan Presto, NL) per sample and incubated for 2 h at 37°C in a humidified chamber. Arrays are washed four times alternatively with 2 M NaCl 1% Triton X-100 solution and PBS 1X 1% Triton X-100 solution, rinsed three times with distilled water, air dried and exposed on phosphor storage screen (GE-Amersham). It is then scanned with a resolution of 50 microns/pixel on a Storm Imager (GE-

Amersham) and array scans are quantified using in-house developed quantification software in a MatLab environment (Pepscan Presto, NL). Arrays contain 1024 peptides (48 controls, 976 experimental representing redundant phosphorylable motifs identified in the human genome), each in triplicate on an array. One array per sample results in a maximum of 3 data points per peptide. Background is subtracted for all individual spots. Spots are corrected for local minima and maxima on the array and flagged for a number of artefacts. Spots are subsequently filtered using the Kolmogorov-Smirnov statistic at a cut-off of $p=0.001$, to exclude spots with a value distribution that cannot be distinguished from the background, and a minimum of 2 values per peptide. As a threshold for significance only ratios corresponding to mean differing $2.0 \times$ (standard error mean 1 + standard error mean 2) are considered.

Treatment of MoDCs

On day 6, immature MoDCs are harvested and washed in RPMIc. MoDCs are then pretreated with the specific pharmacological inhibitor of CK2, CX-4945 (5 μ M, sc-364475, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). After one hour of incubation at 37°C, MoDCs are treated or not with NiSO₄ (500 μ M), or DNCB (10 μ M). The stimulation time at 37°C ranges from 30 min to 24 h depending on the experiment.

CK2 activity assay in MoDCs

The measurement of CK2 activity has been performed as previously described (16). Briefly, reaction is started by addition of the sample lysate (3 μ l) to the reaction mixture (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 30 μ M ATP, 45 μ M of the synthetic peptide RRREDEESDDEE, and 1 μ Ci of (γ -³²P) ATP/reaction in a final volume of 20 μ l). Reaction is performed for 5 min at room temperature and stopped with 60 μ l of 4% cold trichloroacetic acid. After centrifugation of the reaction mixture, the supernatant is spotted on

phosphocellulose paper squares. After three successive 15 min washes in cold phosphoric acid (0.5%), the radioactivity on phosphocellulose paper is counted in scintillation liquid. Results are expressed either as total activity (cpm) or as specific activity (cpm/ μ g protein/min reaction). Protein concentration is determined using the MicroBCA technique (Sigma, Saint Louis, USA).

Functional analysis of MoDC endocytosis: internalization of Dextran-FITC

The endocytic capacity of the cells has been analyzed by the measure of dextran-FITC uptake, a probe for Mannose Receptor-mediated endocytosis. MoDCs are pre-treated for 1 h at 37°C with DMSO or CX-4945 (5 μ M), washed and resuspended in RPMIc at 2×10^6 cells/ml. 100 μ l of the cell suspension are incubated for 1 min at 37°C (or at 4°C for controls) before the addition of 100 μ l of 1 mg/ml dextran-FITC (Molecular weight 40 kDa, Molecular probes Life technologies, Saint Aubin, France) solution for different times. At 15 min, 30 min, 1 h or 2 h, the reaction is stopped by adding 4 ml of cold PBS then cells are washed four times with cold PBS. The uptake of dextran-FITC is analyzed by flow cytometry using a FACsCalibur.

Flow cytometric analysis of MoDC maturation

After 24 h of treatment with DMSO or CX-4945 and/or chemical sensitizers (NiSO₄ or DNCB) the MoDCs phenotype is analyzed by flow cytometry. The labeling procedure is performed as follows: 2×10^5 cells/ml cells are washed in cold phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 0.5% of bovine serum albumin (BSA) and stained with monoclonal antibodies (mAbs) in the dark on ice for 20 min. After washing with cold PBS, cells are fixed in 1% paraformaldehyde diluted in PBS. The following mAbs have been used: FITC-labeled mouse anti-human CD86 (2331, [FUN-1], BD Biosciences), anti-human CD40 (5C3, BD Biosciences) and anti-human PDL-1 (CD274) (MIH1, BD Biosciences); allophycocyanin

(APC)-conjugated mouse anti-human CD83 (HB15e, BD Biosciences), anti-human CD54 (HA58, BD Biosciences) and anti-human HLA-DR (G46-6, BD Biosciences). Appropriate isotype controls (mouse IgG1 κ , BD Biosciences) have been used at the same concentration to determine nonspecific staining. A minimum of 10 000 cells were analyzed on a FACSCalibur[®] cell analyzer using CellQuest[®] software (Becton Dickinson). Living cells were identified on the basis of their physical characteristics [forward scatter (FSC) and side scatter (SSC)]. Results are expressed as the relative fluorescence intensity (RFI), using the corrected mean fluorescence intensity (cMFI), as follows: $cMFI = MFI \text{ of cells} / MFI \text{ of isotype control}$; $RFI = cMFI \text{ of treated cells} / cMFI \text{ of untreated cells}$.

Quantitative real-time RT-PCR assay of cytokines in MoDCs

Total RNA is extracted after lysis of 6h treated MoDCs (10^6 cells/ml) in RNA-PLUS reagent (MP Biomedicals, California, USA). Total RNA pellets are resuspended in RNase-free water and quantified by spectrophotometry. First-strand cDNA is synthesized from total RNA by using a Biometra thermocycler (Biometra, Goettingen, Germany). The reaction uses 1 μ g of total RNA, a deoxynucleotide triphosphate mixture (containing 25 mM deoxy-adenosine triphosphate, deoxyguanosine triphosphate, deoxy-cytidine triphosphate, and deoxy-thymidine triphosphate) and 50 μ M oligo (dT) primers (MWG Biotech, Ebersberg, Germany). Reverse transcription is carried out in 1x AMV reverse transcriptase reaction buffer (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) with RNase inhibitor (RNasine, Promega) at 40 U/ μ l, AMV reverse transcriptase (Promega) at 10 U/ μ l, and RNase-free water to a final volume of 10 μ l. A control without reverse transcriptase is used to confirm the absence of DNA contamination. Real-time PCR was performed using the SYBR Green technology on a Biorad CFX96 system. Each reaction mix consists of 1:50 diluted cDNA in 4 μ l final of nuclease-free water, 0.5 μ M each forward (fwd) and reverse (rev) primer for *irf-1*, *irf-4*, *irf-8*,

gapdh, *β-actin*, and Sso Advanced Supermix (Biorad, Marne-la-Coquette, France) in a total reaction volume of 10 µl. The following specific primers are used (forward and reverse, respectively): *irf-1*: 5'-ACC CTG GCT AGA GAT GCA GA-3' and 5'-TTT TCC CCT GCT TGT ATC G-3'; *irf-4*: 5'-AGC ATC TTC CGC ATC CCC-3' and 5'-CAT CTG CGG GTC CTC CAA-3'; *irf-8*: 5'-GAC AGT GGC TGA TCG AGC AG-3' and 5'-CTT CCA AGT GGC TGG TTC AGC-3'; *gapdh*: 5'-CAG CCT CAA GAT CAT CAG CA-3' and 5'-TGT GGT CAT GAG TCC TTC CA-3'; *β-actin*: 5'-GGC ATC CTC ACC CTG AAG TA-3' and 5'-GCA CAC GCA GCT CAT TGT AG-3'.

After 30 s at 95°C for Sso7dfusion polymerase activation, amplification is allowed to proceed for 44 cycles, each consisting of denaturation at 95°C for 5 s and annealing/extension at 62°C for 5 s. Eightfold serial dilutions of mixed cDNA (from different samples) are analyzed for each target gene, allowing us to construct linear standard curves from which the efficiency (E) of each PCR run is evaluated. SYBR green fluorescence is detected at the end of each elongation cycle, after which a melting curve was constructed to confirm the specificity of the PCR products. Quantification is performed with Biorad CFX Manager Software, and data are analyzed with the delta-delta Ct method ($\Delta\Delta Ct$). Ratios are calculated as the geometrical mean of $(1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$ values, where E is the efficiency and $\Delta\Delta Ct$ is the target gene expression of treated cells compared to normal levels in untreated cells, with correction for the expression of the reference genes *β-actin* and *GAPDH*. Results are expressed as the fold factor increase (i.e. ratio of $(1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$ of treated cells / $(1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$ of untreated cells).

MoDC/T-cell co-culture

The capacity of MoDCs to activate CD4⁺ T cells has been evaluated by the use of allogeneic T CD4⁺ lymphocytes labelled with 0.5 µM CFSE following the manufacturer's instructions.

CD4⁺ T cells are isolated from PBMCs by positive selection with the MACS CD4 isolation kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). These T cells are confirmed to have purity greater than 95%, based on CD4 (555349, BD Biosciences) expression evaluated by flow cytometry.

MoDCs are pre-treated or not with CX-4945 (5 μ M) and then stimulated with NiSO₄ or DNCB for 24 h. Treated MoDCs are washed and then cultured with allogeneic CD4⁺ T cells at a 1:10 DC/T-cell ratio for 5 days in RPMI 1640 Glutamax supplemented with 10% AB human serum, in round bottom 96-well plates. On day 5, CD4⁺ T cells proliferation is analyzed by flow cytometry and expressed as the percentage of CFSE^{low} cells present in the sample. Supernatants are then analyzed for cytokine release as described below.

Cytokine quantification in MoDCs and MoDC/T cell culture supernatants

The supernatants of 24h-cultured MoDCs have been assayed for IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β , IL-12p70, IL-23 and MIP-1 β productions using Meso Scale Discovery (MSD, USA) multiplex assay (Human pro-inflammatory Panel-1, Prototype Human IL-23 and Chemokine Panel-1 kits).

Supernatants of MoDC-CD4⁺ T cell co-cultures have also been analyzed for their cytokine production. IFN- γ , IL-5, IL-13, IL-10 and IL-17 (Human pro-inflammatory Panel-1 and V-PLEX Custom Human Cytokine Panel-1 kits) have been quantified using Meso Scale Discovery (MSD, USA) multiplex assay.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Differences between groups were evaluated with the Mann–Whitney U test (Prism software, GraphPad, La Jolla, CA). *p* values below 0.05 were considered as significant.

Results

Phosphokinome array

MoDCs from donors exhibiting at least a 1.5 fold increase of CD86 and phosphorylation of p38 MAPK at 30 and 60 min in response to chemical sensitizers have been analysed. As many upstream kinases are activated in response to the chemicals, only the top five of up-regulated kinases are presented for each time and each chemical (Fig. 1).

We show that DNCB and NiSO₄ activate different kinase profiles important for DCs biological process (Fig. 1). We find that two of these kinases are highly activated by both chemicals at both times (30 min and 60 min): ERK and CK2 subunits α or α' . Furthermore, CDC2, PKC, JNK, DNA-PKC and Fyn are also highly activated but have already been described as key players in DCs activation and function such as ERK (17–21). Among all these kinases, only CK2 was a new kinase that has not been described to play a role in DC biology to date. Thus, we have chosen to evaluate the role of CK2 in NiSO₄- and DNCB-stimulated MoDCs.

Inhibition of CK2 activity by CX-4945 does not modulate the uptake of dextran-FITC by MoDCs.

To address the role of CK2, we have used a specific pharmacological inhibitor of CK2, CX-4945. CX-4945 is a potent small inhibitor of CK2 displaying an excellent kinase selectivity profile (22) and inhibits drastically CK2 activity at 5 μ M without cytotoxicity in MoDCs (supplementary data).

DCs have three main functions: endocytosis, migration and antigen presentation to T lymphocytes. First, we have examined whether the inhibition of CK2 activity by CX-4945 impairs endocytic capacity, analyzed by dextran-FITC uptake by immature MoDCs. Cells are

thus pretreated or not with CX-4945 for 1h, washed and incubated with dextran-FITC solution at 37°C for different times (Fig. 2). MoDCs endocytic capacity is identical in presence or in absence of CX-4945. As negative control, similar experiments are performed at 4°C, in which the uptake of dextran-FITC by MoDCs is inhibited. These data indicate that CK2 does not control endocytic activity in MoDCs.

Inhibition of CK2 activity downregulates the expression of key surface markers for MoDCs maturation.

Since MoDCs activated by contact sensitizers have been shown to acquire a mature phenotype, we have evaluated the role of CK2 in the acquisition of a mature phenotype in response to NiSO₄ or DNCB. After incubation with CX-4945 for 1h, MoDCs are stimulated for 24h with NiSO₄ or DNCB and the expression of several MoDC maturation markers is quantified by flow cytometry. As previously described, NiSO₄ and DNCB induce MoDCs maturation (8, 9, 23), as shown by the increased expression of CD86, CD83, CD40, PDL-1 and MHC II (Fig. 3A and 3B). Contrary to NiSO₄, DNCB does not increase CD54 expression in our hands.

Pretreatment of MoDCs with CX-4945 significantly decreases NiSO₄-induced upregulation of CD86, PDL-1 and CD54 expression, with the following percentage reductions: CD86: 44 ± 7%, PDL-1: 60 ± 8% and CD54: 36 ± 7%. Only a slight decrease is observed for CD83 and CD40 (Fig. 3A). Pretreatment of DNCB-stimulated MoDCs with CX-4945 significantly decreases PDL-1, CD54 and CD40 expression, with the following percentage reductions: PDL-1: 38 ± 8%, CD54: 57 ± 10%, CD40: 40 ± 8% (Fig. 3B).

In control cells, CK2 does not modulate the expression of the studied markers CD86, CD83, PDL-1, CD54 and CD40 but negatively controls basal MHC II expression. Indeed, control

cells pretreated with CX-4945 exhibit a significant increase of MHC II expression (Fig. 3A and 3B).

These results show that CK2 controls PDL-1 and CD54 expression in response to DNCB and NiSO₄, while CK2 controls CD86 expression in response to NiSO₄ and CD40 in response to DNCB.

Taken together, these *data* demonstrate that the inhibition of CK2 activity prevents full MoDCs phenotypic maturation in response to DNCB and NiSO₄.

Inhibition of CK2 activity modulates cytokine production by MoDCs.

Then, we have quantified cytokine production in MoDCs' supernatants using a MSD Multiplex assay. Cytokines are measured 24h after NiSO₄- or DNCB-stimulation of MoDCs, pretreated or not with CX-4945. Both NiSO₄ and DNCB stimulation induce the production of pro-inflammatory cytokines, IL-6 and TNF- α , and chemokines CCL-4 and CXCL-8 in MoDCs. Only NiSO₄ induces a relevant production of IL-1 β and IL-23 (Fig. 4A and 4B). In response to NiSO₄, inhibition of CK2 activity has no effect on CXCL-8 production, whereas IL-1 β and IL-23 productions are up-regulated compared to NiSO₄-stimulated MoDCs (Fig. 4A). Moreover, CX-4945 pretreatment leads to a decrease of IL-6, TNF- α and CCL-4 production in NiSO₄-stimulated MoDCs. In response to DNCB, CXCL-8 is down-regulated in MoDCs pretreated with CX-4945 (Fig. 4B). However, TNF- α production is increased in absence of CK2 activity in DNCB-stimulated MoDCs.

Taken together, these results evidence that CK2 plays a role in the production of several pro-inflammatory cytokines by MoDCs in response to NiSO₄ and DNCB.

Inhibition of CK2 activity impairs the capacity of DNCB and NiSO₄-treated MoDCs to activate CD4⁺ T lymphocyte proliferation.

Since we show that CK2 is involved in MoDCs mature phenotype acquisition and cytokine production, we have then studied the capacity of CX-4945-pretreated MoDCs to activate CD4⁺ T lymphocytes. Although NiSO₄ and DNCB are known to trigger contact hypersensitivity mainly through CD8⁺ cytotoxic effector T lymphocytes in mice (3), the question is to evaluate the importance of the CK2 activity in the functional capacity of human DCs to activate CD4⁺ T lymphocytes, a key step to initiate a full immune response (24).

NiSO₄- or DNCB- stimulated MoDCs pretreated or not with CX-4945 are co-incubated with allogeneic CD4⁺ T lymphocytes loaded with CFSE. Proliferation is evaluated on day 6 as the percentage of CFSE^{low} CD4⁺ T cells. In the absence of DC treatment with NiSO₄ or DNCB, less than 30% of CD4⁺ T cells are CFSE^{low}. Pretreatment of MoDC with CX-4945 has no effect on CD4⁺ T cell proliferation in the absence of NiSO₄ or DNCB stimulation (Fig. 5A and 5B). NiSO₄- or DNCB- stimulated MoDCs augment the proliferation of CD4⁺ T lymphocytes with 49 ± 5% and 41 ± 3% of CFSE^{low} cells respectively. The proliferation of CD4⁺ T lymphocytes co-cultured with MoDCs pretreated with CX-4945 and then stimulated with NiSO₄ tends to be decreased (38 ± 5 % of CFSE^{low} cells) (Fig. 5A). However, T-cell proliferation is significantly decreased when MoDCs are pretreated with CX-4945 and then stimulated with DNCB (23 ± 2 % of CFSE^{low} cells) (Fig. 5B).

Collectively, these findings reveal that CK2 activity is involved in the capacity of NiSO₄- or DNCB- stimulated MoDCs to augment CD4⁺ T cell proliferation.

Inhibition of CK2 affects CD4⁺ T cell polarization induced by DNCB- and NiSO₄-activated MoDCs

CK2 appears to have an important role in MoDCs ability to activate CD4⁺ T lymphocyte proliferation and to modulate key cytokine production known to be involved in T cell polarization. We thus address its role in T cell polarization. MoDCs are incubated for 24 h with or without DNCB or NiSO₄ in presence or in absence of CX-4945, and then co-cultured with allogeneic CD4⁺ T lymphocytes. Cytokine production of activated T lymphocytes is evaluated 5 days later by quantifying cytokines in cell culture supernatants using a MSD Multiplex assay (Fig. 6). Since a high variability between donors is observed, results are expressed as fold increase compared to control DMSO or medium. As expected, NiSO₄- or DNCB-stimulated MoDCs augment the secretion of IFN γ by T cells, whereas IL-17 is only produced in the presence of NiSO₄-stimulated DCs. In absence of CK2 activity in DCs, secretion of IFN γ by T cells is downregulated in response to MoDC treated with either chemical (Fig. 6A and 6B). However, IL-17 production is maintained in the absence of CK2 activity, in response to MoDC treated with NiSO₄ (Fig. 6A). These results suggest that CK2 in DCs controls Th1 polarization by controlling T cells IFN γ secretion in response to both NiSO₄ and DNCB.

For Th2 cytokines, IL-5 and IL-13, inhibition of CK2 augments the level of these cytokines in conditions where MoDCs are not treated with either NiSO₄ or DNCB. These results suggest that CK2 activity could negatively regulate IL-5 and IL-13 expressions upon T-cell activation. However, in the absence of CK2 activity, cytokine levels are comparable to the one observed without the CK2 inhibition.

Inhibition of CK2 activity modulates mRNA expression of IRFs, key transcription factors in DCs and involved in T cell polarization.

Since the initiation of (Th1/Th17)/Th2 response is dependent on the expression of members of the 'Interferon Regulatory Factors' (IRFs) family in DCs, we have analysed by RT-qPCR the expression in MoDCs of the main IRFs described in T cell polarization: *irf-1*, *irf-4* and *irf-8*.

NiSO₄ stimulation induces the up-regulation of *irf-1*, *irf-8* and *irf-4* mRNA expression (Fig. 7A) whereas CX-4945 pretreatment of MoDCs before NiSO₄-stimulation leads to a strong downregulation of all the tested IRF mRNA expression. DNCB stimulation induces mRNA expression of *irf-1*, downregulates mRNA expression of *irf-4* and does not modulate *irf-8* mRNA (Fig. 7B). Loss of CK2 activity with CX-4945 pretreatment before DNCB stimulation leads to a significant decrease of *irf-1* mRNA expression. Interestingly, *irf-4* mRNA in MoDC expression is significantly increased in the absence of CK2 activity without chemical stimulation (Fig 7A and 7B).

DNCB and NiSO₄ induce the expressions of *irf* mRNA in a different manner. However, the three IRF (*irf-1*, *irf-4* and *irf-8*) induced in response to NiSO₄ and *irf-1* induced by DNCB-stimulation are regulated by CK2.

Discussion

Allergic contact dermatitis is a T-cell inflammatory disease wherein DCs play a crucial role. Chemical sensitizers like NiSO₄ and DNCB have been demonstrated to induce the expression of markers related to DCs maturation and function and the production of pro-inflammatory cytokines. Furthermore, these chemicals induce the phosphorylation of MAPK family proteins and the activation of the NF- κ B pathway, mimicking the effects of danger signals and leading to the acquisition of a mature phenotype by DCs (7–9, 11–13).

Using a peptide array approach, we identify a new kinase protein kinase CK2 (formerly casein kinase 2), playing a role in the acquisition of a mature phenotype in DCs in response to DNCB and NiSO₄, two well-known contact sensitizers. CK2 has been described to participate in the activation of several major signalling pathways as Ras-Raf-MEK-ERK, p38 MAPK, PKC, and PI3 kinase-Akt, and to phosphorylate different MAPK's effectors (25). In this work, we have studied the role of CK2 in DC activation in response to contact sensitizers.

We find that CK2 controls both phenotypic and functional maturation of DC in response to NiSO₄ and DNCB. Our data are the first demonstrating such a role for CK2 in DCs. The inhibition of CK2 prevents NiSO₄-induced PDL-1, CD54 and CD86 up-regulation and prevents DNCB-induced PDL-1 and CD54 up-regulation. The significant up-regulation of phenotypic markers in DCs in response to NiSO₄ and DNCB are in agreement with other data from the literature (26, 27). Furthermore, CK2 inhibition in NiSO₄-stimulated MoDC reduces the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α , but leads to an up-regulation of IL-23 and IL-1 β , cytokines involved in the Th17 response (31). Related to DNCB, the absence of CK2 activity reduces the production of the pro-inflammatory cytokine CXCL-8, but augments TNF- α production.

The main function of mature DCs is antigen-presentation and activation of antigen-specific T cells, leading to their proliferation and the production of cytokines essential for T cell polarization (28). In our study, we demonstrate that NiSO₄- or DNCB-stimulated MoDCs increase the proliferation of allogeneic CD4⁺ T cells. In the absence of CK2 activity, the altered mature phenotype of NiSO₄-stimulated MoDCs does not affect T CD4⁺ lymphocytes proliferation, while DNCB-stimulated MoDCs are not able to maintain T lymphocyte proliferation.

NiSO₄-stimulated MoDC produce IL-17, already described *in vivo* and *in vitro* by other groups (26, 29). In response to contact allergens, *in vitro*, DCs preferentially secrete cytokines that polarize the T cell response towards Tc1/Th1 and Tc17/Th17 effector T cells (30). In ACD caused by nickel, there is a massive cellular infiltration dominated by CD4⁺ T cells producing IL-17 and IFN- γ in nickel-challenged skin (29). Pickard *et al.* (2007) also showed that DNCB leads to Th1 and Tc1 responses in human exposed to this chemical (24). In our hands, the absence of CK2 activity leads to an alteration of the cytokine profile secreted by T lymphocytes: we observe a decrease in IFN γ production in response to both chemicals whereas IL-17 production is maintained in response to NiSO₄. In the absence of CK2 activity in NiSO₄-stimulated MoDC, IL-23 and IL-1 β could promote Th17 polarization *versus* Th1/Th17 in the absence of CK2 activity. These data support that CK2 activity in DCs drives T cell polarization by preferentially inducing a Th1 response in response to contact sensitizers without modulating Th17 polarization.

The absence of CK2 in unstimulated DCs leads to a spontaneous Th2 polarization by increasing IL-5 and IL-13 production, whereas no effect is observed on allogeneic T CD4⁺ cell proliferation. These results suggest that the absence of CK2 activity in MoDC could lead to a DC phenotype prone to Th2 polarization. Moreover, CK2 activity could be a major regulator of Th2 polarization as Ulges *et al.* who demonstrated that CK2 allows regulatory T

cells (Treg) to suppress excessive Th2 response *in vivo* (31). However, the signal provided by chemical stimulation inhibits the Th2 response induced in the absence of CK2 activity.

The Interferon Regulatory Factors (IRFs) family can directly alter the transcription of cytokine genes by Th cells, and the IRF family controls many aspects of DC biology (32). IRFs govern the development of various DC subsets, promote and modulate DC maturation (33). The main IRF transcription factors involved in T cells polarization are IRF-1, IRF-4 and IRF-8. IRF-1 and IRF-8 are involved in IL-12 synthesis and drive Th1/ Th17 response (32, 34) whereas IRF-4 controls Th2 response (35, 36). In the present work, *irf-1* mRNA is induced in response to both chemicals while *irf-4* and *irf-8* mRNAs are only induced in response to NiSO₄. As already described in another study (34), IRF8 could induce Th1 and Th17 polarization through the production of IL-12 and IL-23 in our model. We find that DC stimulated with NiSO₄ are IRF1⁺⁺IRF8⁺⁺IRF4⁺⁺PD-L1^{high}CD54^{high} DCs, allowing a Th1/Th17 response, and DNCB-stimulated DCs are IRF1⁺PD-L1^{low} CD54^{low} allowing a Th1 response. The absence of IRF-8 and the low IRF-1 expressions could explain the lack of IL-12 and IL-17 productions, in response to DNCB. Inhibition of CK2 activity could convert these DC into IRF1⁺IRF8⁻IRF4⁺PD-L1^{low}CD54^{low} DCs in response to NiSO₄ and into IRF1⁻PD-L1⁻CD54⁻DCs in response to DNCB. This switch is in accordance with the Th17 polarisation in response to NiSO₄ and the absence of Th1 polarisation in response to DNCB in the absence of CK2 activity. Our study also shows that CK2 negatively controls *irf-4* transcription in unstimulated MoDCs. Since IRF-4 has been shown to be a key regulator of DC-Th2 development (37), we could propose that *irf-4* mRNAs induction, in MoDCs, explains the spontaneous Th2 polarization. Neither PDL-2 nor OX40L, two markers described as Th2 inducers, is induced in absence of CK2 activity in unstimulated MoDCs (data not shown). As Ulges *et al.* have demonstrated, the genetic ablation of the β -subunit of CK2 specifically in

Treg results in the maturation of IRF4⁺PDL-2⁺ DCs required for the development of Th2 response *in vivo*.

In conclusion, this work contributes to a better understanding of the role of CK2 in DC-T cells crosstalk, as recently described (31, 38, 39) and highlights CK2 as a key kinase in chemical sensitizer-induced DCs phenotype modulation, cytokine production and T CD4⁺ lymphocyte polarization. CK2 controls Th1 response through IFN- γ secretion by T cells and maintains Th17 polarization through IL-1 β and IL-23 production by DCs. As a transcription modulator, CK2 triggers an efficient immune response since this kinase modulates mRNA expression of several cytokines (data not shown) and transcription factors involved in T cell response. We also confirm that CK2 is a key kinase in the control of the Th2 response. Our study brings a novelty function of CK2 in response to contact sensitizers in DC.

Aknowledgments

We thank the Platform Trans-Prot (IPSIT-UPSud) and Claudine Deloménie for technical assistance.

References

1. Peiser, M., T. Tralau, J. Heidler, A. M. Api, J. H. Arts, D. A. Basketter, J. English, T. L. Diepgen, R. C. Fuhlbrigge, A. A. Gaspari, J. D. Johansen, A. T. Karlberg, I. Kimber, J. P. Lepoittevin, M. Liebsch, H. I. Maibach, S. F. Martin, H. F. Merk, T. Platzek, T. Rustemeyer, A. Schnuch, R. J. Vandebruel, I. R. White, and A. Luch. 2011. Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. Current knowledge assembled at an international workshop at BfR, Germany. *Cell Mol Life Sci* 69: 763–781.
2. Kaplan, D. H., B. Z. Igyártó, and A. A. Gaspari. 2012. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat. Rev. Immunol.* .
3. Vocanson, M., A. Hennino, A. Rozieres, G. Poyet, and J. F. Nicolas. 2009. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy* 64: 1699–1714.
4. Freudenberg, M. A., P. R. Esser, T. Jakob, C. Galanos, and S. F. Martin. 2009. Innate and adaptive immune responses in contact dermatitis: analogy with infections. *G. Ital. Di Dermatologia E Venereol. Organo Uff. Soc. Ital. Di Dermatologia E Sifilogr.* 144: 173–185.
5. Warshaw, E. M., D. V Belsito, J. S. Taylor, D. Sasseville, J. G. DeKoven, M. J. Zirwas, A. F. Fransway, C. G. T. Mathias, K. A. Zug, V. A. DeLeo, J. F. Fowler Jr, J. G. Marks, M. D. Pratt, F. J. Storrs, and H. I. Maibach. 2013. North American Contact Dermatitis Group patch test results: 2009 to 2010. *Dermat. contact, atopic, Occup. drug* 24: 50–59.
6. Friedmann, P. S., C. Moss, S. Shuster, and J. M. Simpson. 1983. Quantitation of sensitization and responsiveness to dinitrochlorobenzene in normal subjects. *Br. J. Dermatol.* 109 Suppl : 86–88.
7. Boisleve, F., S. Kerdine-Romer, N. Rougier-Larzat, and M. Pallardy. 2004. Nickel and DNCB induce CCR7 expression on human dendritic cells through different signalling pathways: role of TNF-alpha and MAPK. *J Invest Dermatol* 123: 494–502.
8. Ade, N., D. Antonios, S. Kerdine-Romer, F. Boisleve, F. Rousset, and M. Pallardy. 2007. NF-kappaB plays a major role in the maturation of human dendritic cells induced by NiSO(4) but not by DNCB. *Toxicol Sci* 99: 488–501.
9. Aiba, S., H. Manome, S. Nakagawa, Z. U. A. Mollah, M. Mizuashi, T. Ohtani, Y. Yoshino, and H. Tagami. 2003. p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and 2,4-dinitrochlorobenzene. *J. Invest. Dermatol.* 120: 390–399.
10. Toebak, M. J., P. R. Pohlmann, S. C. Sampat-Sardjoepersad, B. M. E. Von Blomberg, D. P. Bruynzeel, R. J. Scheper, T. Rustemeyer, and S. Gibbs. 2006. CXCL8 secretion by dendritic cells predicts contact allergens from irritants. *Toxicol. Vitro.* 20: 117–124.
11. Arrighi, J. F., M. Rebsamen, F. Rousset, V. Kindler, and C. Hauser. 2001. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic

cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol* 166: 3837–3845.

12. Boislevé, F., S. Kerdine-Romer, and M. Pallardy. 2005. Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF-alpha. *Toxicology* 206: 233–244.

13. Antonios, D., P. Rousseau, A. Larange, S. Kerdine-Romer, and M. Pallardy. 2010. Mechanisms of IL-12 synthesis by human dendritic cells treated with the chemical sensitizer NiSO₄. *J Immunol* 185: 89–98.

14. Neves, B. M., M. Goncalo, A. Figueiredo, C. B. Duarte, M. C. Lopes, and M. T. Cruz. 2011. Signal transduction profile of chemical sensitizers in dendritic cells: an endpoint to be included in a cell-based in vitro alternative approach to hazard identification? *Toxicol Appl Pharmacol* 250: 87–95.

15. Singh, N. N., and D. P. Ramji. 2008. Protein kinase CK2, an important regulator of the inflammatory response? *J Mol Med* 86: 887–897.

16. Filhol, O., C. Cochet, P. Wedegaertner, G. N. Gill, and E. M. Chambaz. 1991. Coexpression of both alpha and beta subunits is required for assembly of regulated casein kinase II. *Biochemistry* 30: 11133–11140.

17. Ma, C., M. Muranyi, C. H. Chu, J. Zhang, and W.-M. Chu. 2013. Involvement of DNA-PKcs in the IL-6 and IL-12 response to CpG-ODN is mediated by its interaction with TRAF6 in dendritic cells. *PLoS One* 8: e58072.

18. Cejas, P. J., L. M. Carlson, J. Zhang, S. Padmanabhan, D. Kolonias, I. Lindner, S. Haley, L. H. Boise, and K. P. Lee. 2005. Protein kinase C betaII plays an essential role in dendritic cell differentiation and autoregulates its own expression. *J. Biol. Chem.* 280: 28412–28423.

19. Rescigno, M., M. Martino, C. L. Sutherland, M. R. Gold, and P. Ricciardi-Castagnoli. 1998. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J. Exp. Med.* 188: 2175–2180.

20. Koga, Y., A. Matsuzaki, A. Suminoe, H. Hattori, and T. Hara. 2008. Expression of cytokine-associated genes in dendritic cells (DCs): Comparison between adult peripheral blood- and umbilical cord blood-derived DCs by cDNA microarray. *Immunol. Lett.* 116: 55–63.

21. Yanagawa, Y., N. Iijima, K. Iwabuchi, and K. Onoé. 2002. Activation of extracellular signal-related kinase by TNF-alpha controls the maturation and function of murine dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 71: 125–132.

22. Pierre, F., P. C. Chua, S. E. O'Brien, A. Siddiqui-Jain, P. Bourbon, M. Haddach, J. Michaux, J. Nagasawa, M. K. Schwaebe, E. Stefan, A. Vialettes, J. P. Whitten, T. K. Chen, L. Darjania, R. Stansfield, K. Anderes, J. Bliesath, D. Drygin, C. Ho, M. Omori, C. Proffitt, N. Streiner, K. Trent, W. G. Rice, and D. M. Ryckman. 2011. Discovery and SAR of 5-(3-

chlorophenylamino)benzo[c][2,6]naphthyridine-8-carboxylic acid (CX-4945), the first clinical stage inhibitor of protein kinase CK2 for the treatment of cancer. *J. Med. Chem.* 54: 635–654.

23. Antonios, D., N. Ade, S. Kerdine-Romer, H. Assaf-Vandecasteele, A. Larange, H. Azouri, and M. Pallardy. 2009. Metallic haptens induce differential phenotype of human dendritic cells through activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways. *Toxicol Vitro*. 23: 227–234.

24. Pickard, C., A. M. Smith, H. Cooper, I. Strickland, J. Jackson, E. Healy, and P. S. Friedmann. 2007. Investigation of mechanisms underlying the T-cell response to the hapten 2,4-dinitrochlorobenzene. *J. Invest. Dermatol.* 127: 630–637.

25. Meggio, F., and L. A. Pinna. 2003. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.* 17: 349–368.

26. Hitzler, M., O. Majdic, G. Heine, M. Worm, G. Ebert, A. Luch, and M. Peiser. 2012. Human Langerhans Cells Control Th Cells via Programmed Death-Ligand 1 in Response to Bacterial Stimuli and Nickel-Induced Contact Allergy. *PLoS One* 7.

27. Turbica, I., Y. Gallais, C. Gueguen, H. Tharinger, C. Al Sabbagh, R. Gorges, H. Gary-Gouy, S. Kerdine-Romer, M. Pallardy, L. Mascarell, a. Gleizes, and S. Chollet-Martin. 2015. Ectosomes from neutrophil-like cells down-regulate nickel-induced dendritic cell maturation and promote Th2 polarization. *J. Leukoc. Biol.* 97: 1–13.

28. Bousso, P. 2008. T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 675–684.

29. Dyring-Andersen, B., L. Skov, M. B. Løvendorf, M. Bzorek, K. Søndergaard, J. P. H. Lauritsen, S. Dabelsteen, C. Geisler, and C. Menné Bonefeld. 2013. CD4+ T cells producing interleukin (IL)-17, IL-22 and interferon- γ are major effector T cells in nickel allergy. *Contact Dermatitis* 68: 339–347.

30. Martin, S. F. 2015. New concepts in cutaneous allergy. *Contact Dermatitis* 72: 2–10.

31. Ulges, A., M. Klein, S. Reuter, B. Gerlitzki, M. Hoffmann, N. Grebe, V. Staudt, N. Stergiou, T. Bohn, T.-J. Brühl, S. Muth, H. Yurugi, K. Rajalingam, I. Bellinghausen, A. Tuettenberg, S. Hahn, S. Reißig, I. Haben, F. Zipp, A. Waisman, H.-C. Probst, A. Beilhack, T. Buchou, O. Filhol-Cochet, B. Boldyreff, M. Breloer, H. Jonuleit, H. Schild, E. Schmitt, and T. Bopp. 2015. Protein kinase CK2 enables regulatory T cells to suppress excessive TH2 responses in vivo. *Nat. Immunol.* 16.

32. Lohoff, M., and T. W. Mak. 2005. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 125–135.

33. Gabriele, L., and K. Ozato. 2007. The role of the interferon regulatory factor (IRF) family in dendritic cell development and function. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18: 503–510.

34. Yoshida, Y., R. Yoshimi, H. Yoshii, D. Kim, A. Dey, H. Xiong, J. Munasinghe, I. Yazawa, M. J. O'Donovan, O. A. Maximova, S. Sharma, J. Zhu, H. Wang, H. C. Morse, and

- K. Ozato. 2014. The Transcription Factor IRF8 Activates Integrin-Mediated TGF- β Signaling and Promotes Neuroinflammation. *Immunity* 40: 187–198.
35. Gao, Y., S. a Nish, R. Jiang, L. Hou, P. Licona-Limón, J. S. Weinstein, H. Zhao, and R. Medzhitov. 2013. Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. *Immunity* 39: 722–32.
36. Rengarajan, J. 2002. Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4) Interacts with NFATc2 to Modulate Interleukin 4 Gene Expression. *J. Exp. Med.* 195: 1003–1012.
37. Williams, J. W., M. Y. Tjota, B. S. Clay, B. Vander Lugt, H. S. Bandukwala, C. L. Hrusch, D. C. Decker, K. M. Blaine, B. R. Fixsen, H. Singh, R. Sciammas, and A. I. Sperling. 2013. Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation. *Nat. Commun.* 4: 2990.
38. Sawant, D. V, and A. L. Dent. 2015. It takes CK2 to suppress TH2. *Nat. Immunol.* 16: 224–225.
39. Bird, L. 2015. Regulatory T cells: CK2: keeping TH2 cells in check. *Nat. Rev. Immunol.* 15: 134–134.

Footnotes

This work was supported by grants from the Domaine d'Intérêt Majeur (DIM) de l'Ile de France "Santé et environnement" (for M.D.B. support) and the Region Ile-de-France and ANR 11-CESA-015-01—Allergochem, ANR 2007 – SEST 002 01 – AllergoDC

Legends

Figure 1. MoDCs display important kinase activity in response to NiSO₄ and DNCB.

Peptide microarray analysis of the predicted kinase activity of the top five kinases up-regulated in MoDCs upon 30 min and 60 min stimulation with (A) NiSO₄ 500 μ M or (B) DNCB 10 μ M. Protein lysates of ten independent donors are pooled and results are expressed as fold increase compared to control. ERK: extra-regulated kinase; CK2: protein kinase CK2; DNA-PKC: DNA dependant kinase C; EphA4: Ephrin type-A receptor 4; CDC2: cell division cycle protein 2 homolog; PKC: protein kinase C; FER: (fps/fes related) tyrosine kinase; JNK: c-Jun N-terminal Kinase

Figure 2. Inhibition of CK2 activity does not modulate uptake of dextran-FITC by MoDCs.

MoDCs are incubated with DMSO 0.1% or CX-4945 (CX, 5 μ M) for 1h before incubation with dextran-FITC (0.5 mg/ml) at 37°C for various times, and the uptake of dextran-FITC is analyzed by flow cytometry on a FACsCalibur. MoDCs incubated with dextran-FITC (0.5 mg/ml) at 4°C are used as control. Histogram represents mean fluorescence intensity (MFI) of 3 independent experiments.

Figure 3. Inhibition of CK2 activity downregulates the expression of key surface markers of MoDCs maturation.

Immature MoDCs are pretreated for 1h with DMSO 0.1% or CX-4945 (CX, 5 μ M) and then stimulated for 24h with (A) NiSO₄ 500 μ M or (B) DNCB 10 μ M. After 24h, the expression of cell-surface markers is quantified by flow cytometry. Data represent the result of 5 independent experiments and are expressed as the fold increase over control Medium (for

NiSO₄) or DMSO (for DNCB). *p < 0.05; **p < 0.01 (Mann Whitney test); RFI = Relative fluorescence intensity

Figure 4. Inhibition of CK2 activity modulates cytokine production by MoDCs.

Immature MoDCs are pretreated for 1h with DMSO 0.1% or CX-4945 (CX, 5 μ M) and then stimulated for 24h with (A) NiSO₄ 500 μ M or (B) DNCB 10 μ M. IL-1 β , CXCL-8, IL-6, TNF- α , CCL-4, IL-12p70 and IL-23 levels are quantified in MoDCs supernatants using Multi Scale Discovery Multiplex (MSD) assay. Data represent the result of 5 independent experiments and are expressed in pg/ml. *p < 0.05; **p < 0.01 (Mann Whitney test)

Figure 5. Inhibition of CK2 activity impairs DNCB but not NiSO₄ MoDC-induced CD4⁺ T lymphocyte proliferation.

CFSE-loaded CD4⁺ T lymphocytes are cultured with allogeneic MoDCs pretreated with (A) NiSO₄ 500 μ M or (B) DNCB 10 μ M (ratio 1 T cell: 10 DCs) in the presence or absence of CX-4945 (CX, 5 μ M). On day 6 the percentage of CFSE^{low} cells is determined by flow cytometry. Results are expressed as % of CFSE positive cells, corresponding to T cell proliferation. These results are representative of 6 independent experiments. *: p<0.05; ** p<0.01 (Mann Whitney test)

Figure 6. Inhibition of CK2 activity modulates DNCB and NiSO₄ MoDCs-induced CD4⁺ T lymphocyte polarization.

CD4⁺ T lymphocytes are co-incubated with MoDCs [both immature and (A) NiSO₄- or (B) DNCB- treated] in the absence or presence of CX-4945 (5 μ M). On day 5, cytokines are quantified in the co-culture supernatants using Multi Scale Discovery (MSD) Multiplex assay. Results are expressed as fold increase compared to control Medium or DMSO; and showed as

dot plots (pg/ml). These results are representative of 6 independent experiments. * : $p < 0.05$;
** $p < 0.01$ (Mann Whitney test)

Figure 7. Inhibition of CK2 activity modulates mRNA expression of IRFs in MoDCs.

Immature MoDCs are pretreated for 1h with DMSO 0.1% or CX-4945 (CX, 5 μ M) and then stimulated for 6h with (A) NiSO_4 500 μ M or (B) DNCB 10 μ M. IRF1, IRF8 and IRF4 mRNAs are quantified by real-time RT-PCR. Data represent the result of 5 independent experiments and are normalized to control.*: $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (Mann Whitney test)

Supplementary data

Supplementary data 1. CK2 activity assay

MoDCs are pretreated for 1h with CX-4945 (CX, 5 or 10 μ M) and stimulated for 6 hours with NiSO_4 (500 μ M) or DNCB (10 μ M). CK2 activity is measured using incorporation of (γ - ^{32}P) ATP using a synthetic peptide specific for CK2. Results are expressed as total activity (cpm) and are representative of 3 independent experiments.

Supplementary data 2. Cell viability

MoDCs are pretreated for 1h with CX-4945 (CX, 5 μ M) and stimulated for 24 hours with (A) NiSO_4 (500 μ M) or (B) DNCB (10 μ M). Cell viability is assessed by propidium iodide incorporation using flow cytometry. Results are expressed as percentage of living cells and are representative of 3 independent experiments.

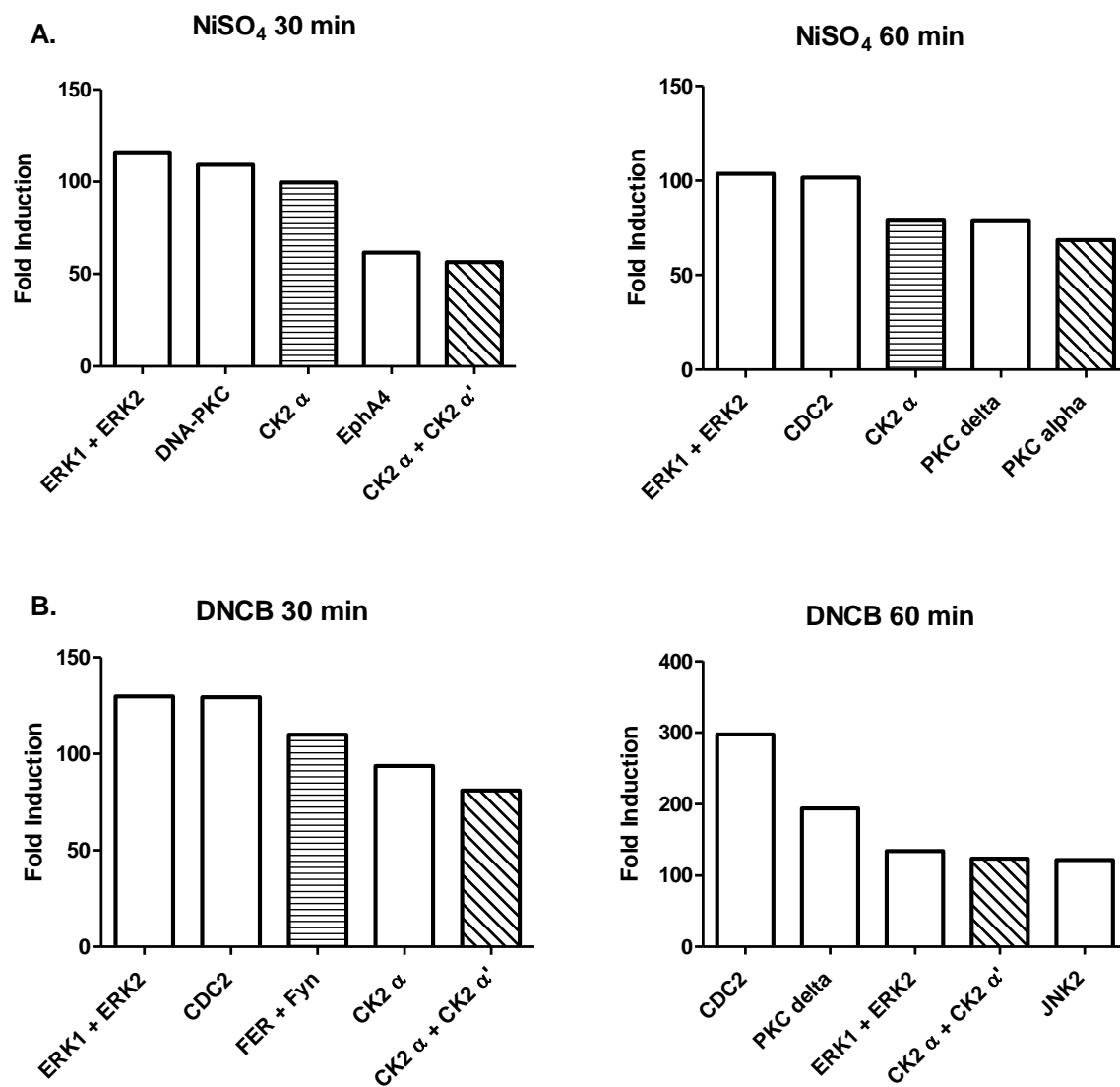


Figure 1

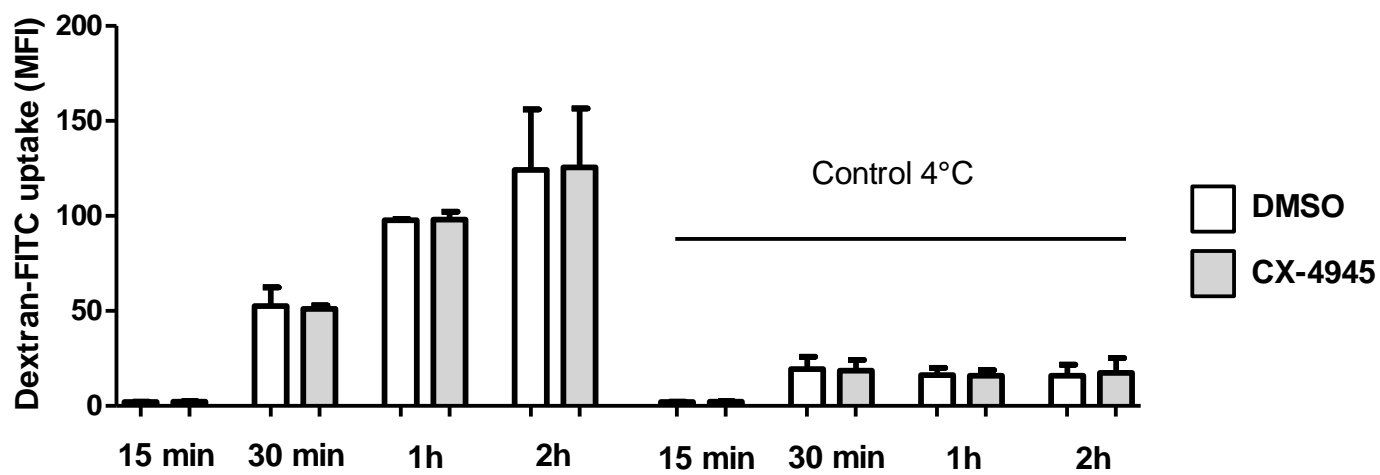


Figure 2

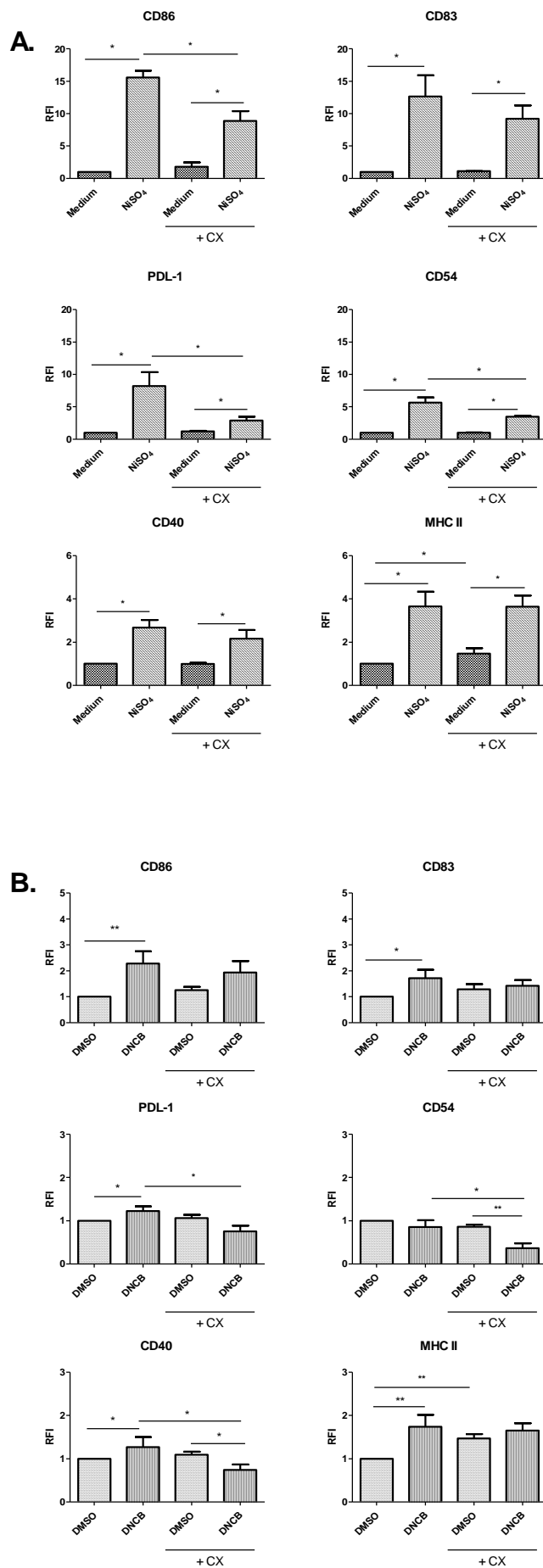


Figure 3

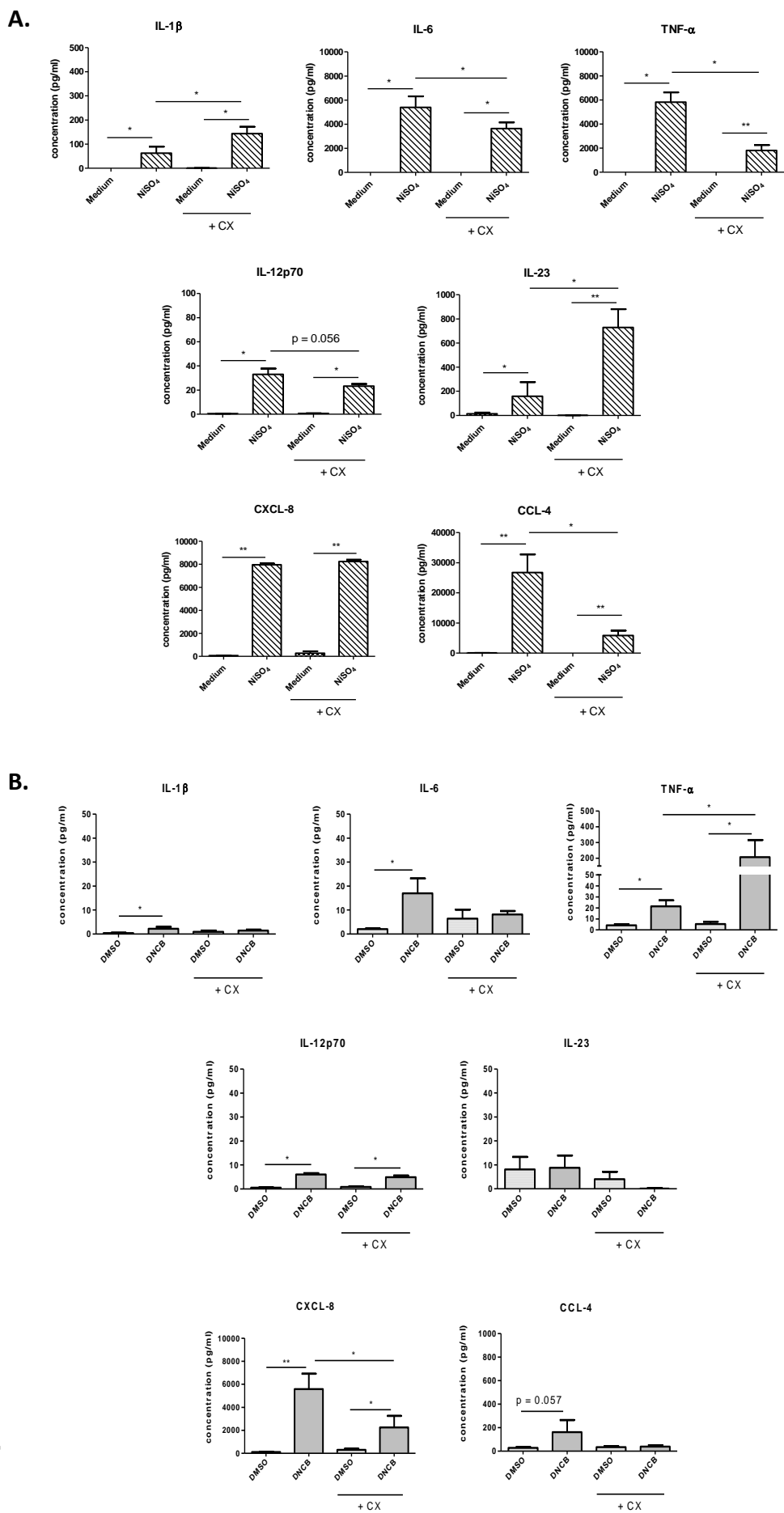


Figure 4

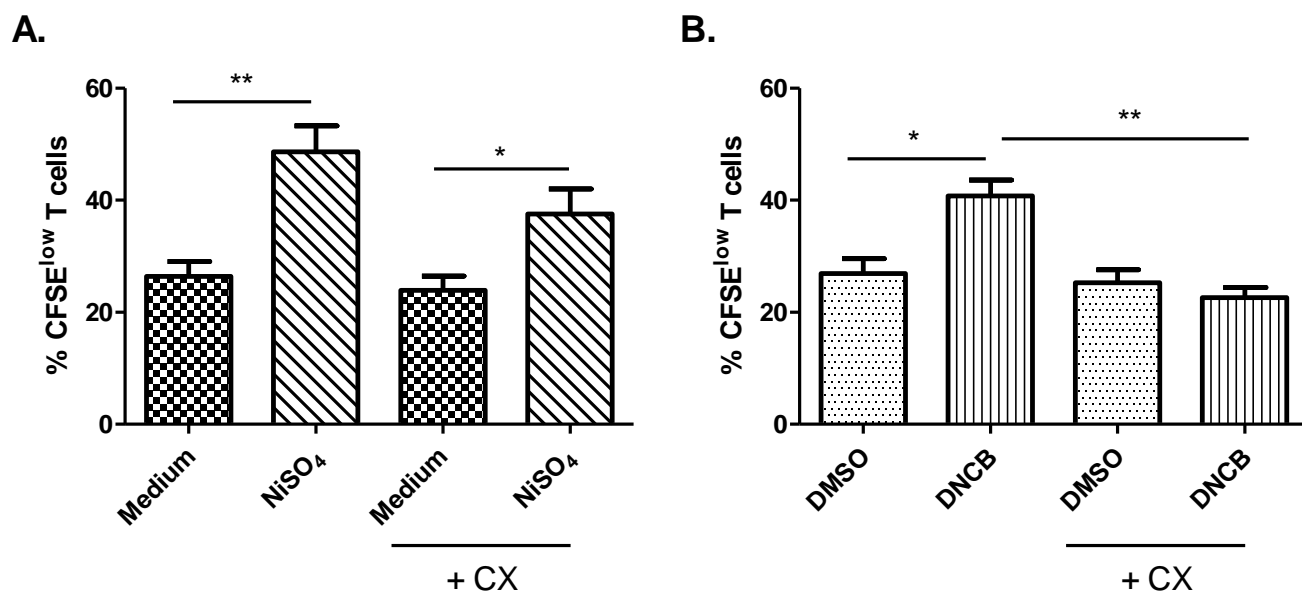


Figure 5

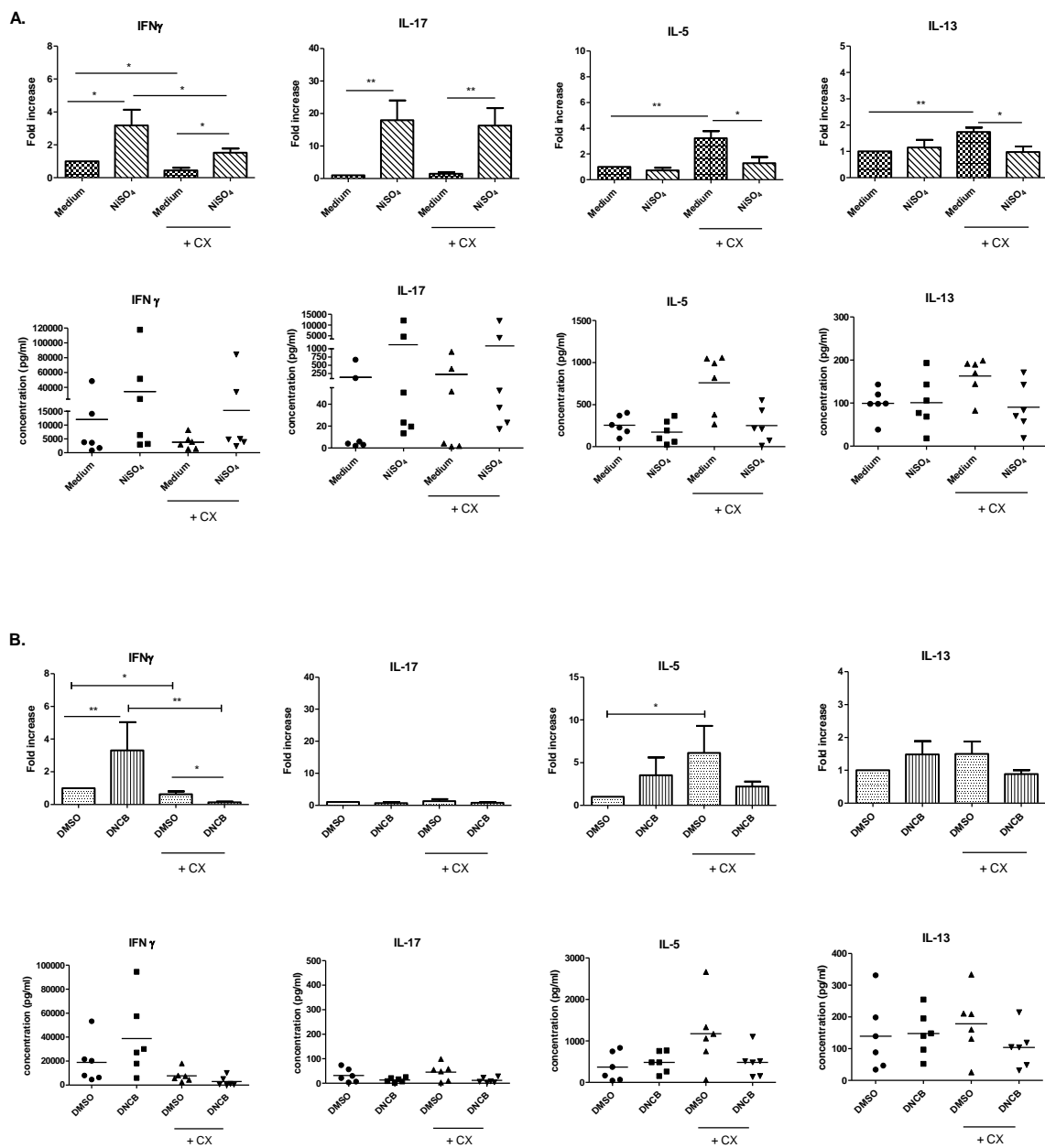


Figure 6

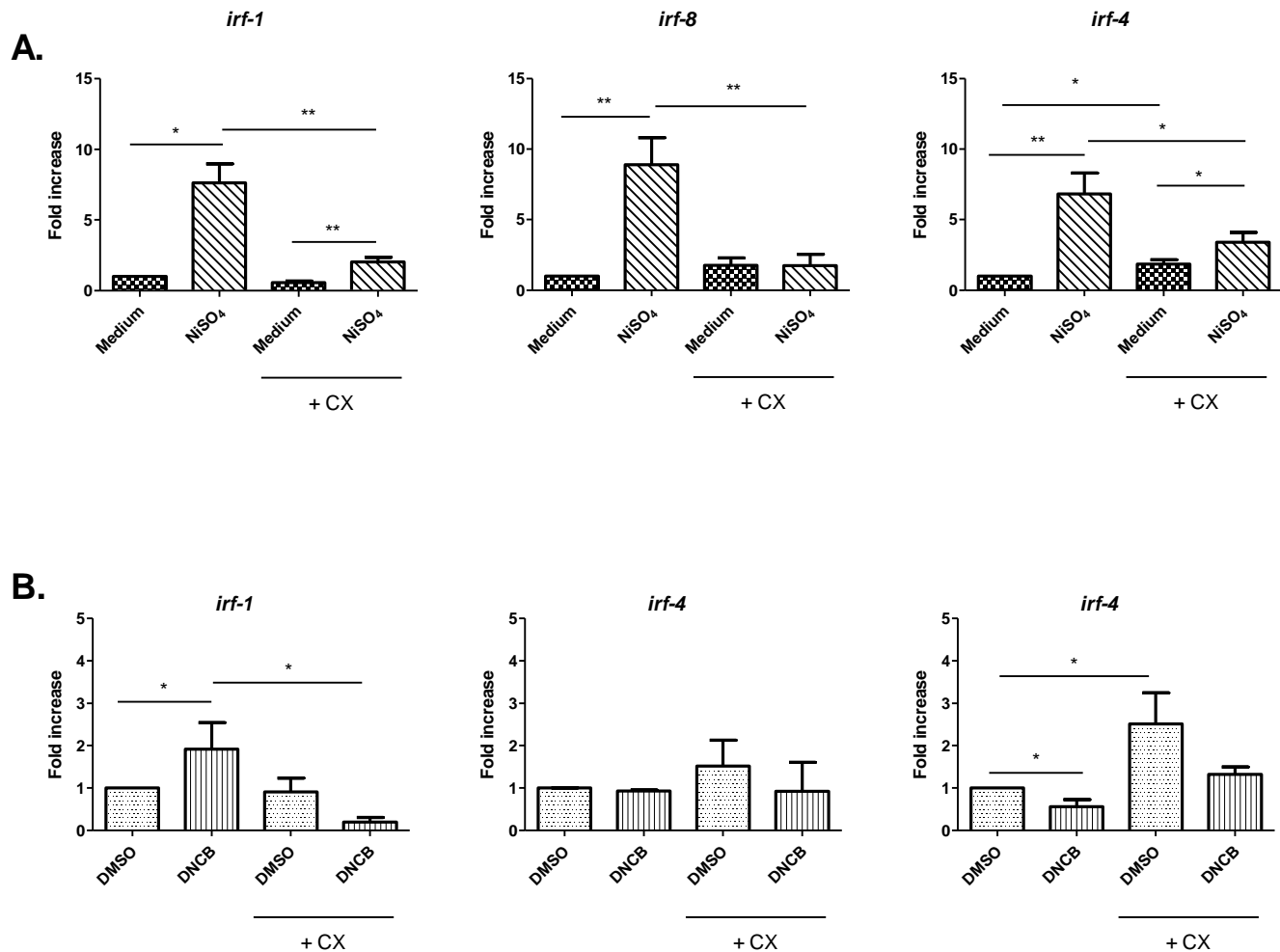
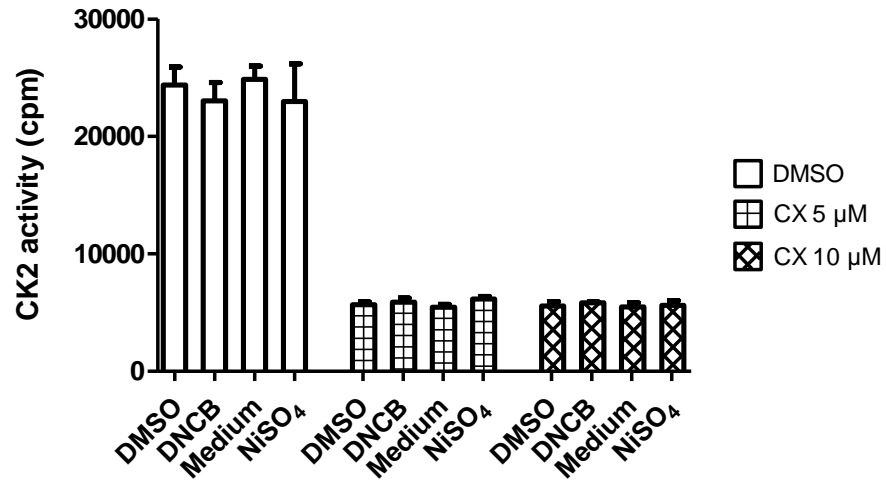
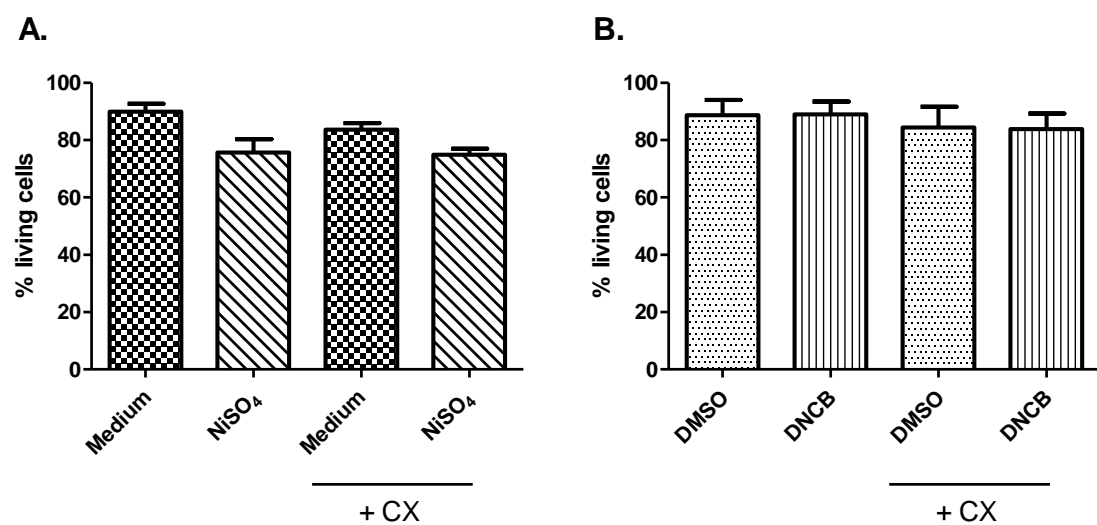


Figure 7

CK2 activity measurement



Supplementary data 1



Supplementary data 2

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Mécanismes d'activation du facteur de transcription Nrf2 dans les cellules de l'immunité en réponse aux molécules allergisantes

1. Introduction

Le facteur de transcription Nrf2 joue un rôle majeur dans la lutte contre le stress oxydant et électrophile ainsi que dans la détoxification des xénobiotiques. En effet, Nrf2 régule la transcription de nombreux gènes codant pour des protéines antioxydantes telles que l'hème oxygénase (HO-1) et des enzymes de phase II telles que la NADPH quinone-oxydoréductase 1 (NQO-1) (Baird and Dinkova-Kostova, 2011).

Il a récemment été mis en évidence que Nrf2 contrôle la réponse inflammatoire d'origine allergique (El Ali *et al.*, 2013). Par ailleurs, Nrf2 s'accumule spécifiquement en réponse aux molécules allergisantes dans les DC, contrairement aux molécules irritantes (Ade *et al.*, 2009; Migdal *et al.*, 2013). Les molécules allergisantes cutanées telles que le 2,4-dinitrochlorobenzène (DNCB) et le sulfate de nickel (NiSO_4) sont capables de mimer un signal de danger et activent les voies des MAPK et NF- κ B qui contrôlent l'acquisition d'un phénotype mature des DCs (Ade *et al.*, 2007; Boisleve *et al.*, 2005). Enfin, la protéine kinase CK2 (formellement caséine kinase II) est activée en réponse aux molécules allergisantes dans les MoDC et joue un rôle important dans l'activation des DCs et la réponse lymphocytaire T (de Bourayne *et al.*, soumis dans JI).

Les mécanismes qui mènent à l'activation de Nrf2 sont complexes et semblent dépendre d'une part du modèle cellulaire et de la nature de la molécule activatrice. Plusieurs études ont décrit que les MAPK participent à l'activation de Nrf2 (Alam *et al.*, 2000; R Yu *et al.*, 2000) en assurant sa phosphorylation de manière directe ou indirecte. D'autre part, la CK2 assure la phosphorylation directe du domaine de transactivation de Nrf2, lui permettant de transloquer au noyau afin d'activer la transcription de ses gènes cibles en réponse au tert-butylhydroquinone (tBHQ) (Apopa *et al.*, 2008).

Cette étude a pour objectif d'étudier finement les réactions croisées entre les kinases activées par les molécules allergisantes et la voie Nrf2/Keap1 et d'identifier les voies de signalisation menant à un complexe transcriptionnel actif.

Pour ce faire, nous avons travaillé sur la lignée cellulaire myéloïde pro-monocytaire THP1, validée par l'ECVAM comme modèle cellulaire pour le HCLAT qui vise à détecter le potentiel allergisant des molécules chimiques en mesurant l'augmentation de deux marqueurs de maturation de la DC, CD86 et CD54, après 24h de stimulation par la molécule à tester (Ashikaga *et al.*, 2006).

Nous montrons ici que la CK2 est indispensable à l'activité transcriptionnelle de Nrf2 en permettant l'expression des ARNm codant pour *nqo-1* et *ho-1*, deux gènes cibles de Nrf2, en réponse au DNCB et au CinA. De plus, nous avons mis en évidence que c-Jun se fixe aux séquences ARE en réponse au DNCB et au CinA. Enfin, c-Jun est lié à Nrf2 en réponse au DNCB mais pas en réponse au CinA.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Modèle cellulaire : lignée cellulaire THP1

Les cellules THP1 (ATCC numéro : TIB-202TM) sont mises en culture à 37°C sous une atmosphère humide à 5% de CO₂. Les cellules sont cultivées à la concentration de 2 à 4×10⁵ cellules/ml et sont ensemencées avec du β-mercaptoéthanol [(βME), 50μM]. Leur concentration ne dépasse pas 1×10⁶ cellules/ml. Les cellules sont entretenues dans un milieu de culture RPMI enrichi avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes, 1% pénicilline-streptomycine et 1% de sodium pyruvate (RPMI complet = RPMIc) [Gibco Invitrogen, Paisley, UK].

2.2. Traitement des cellules par les différentes molécules chimiques

- **Traitement des THP1 par les molécules allergisantes**

Les cellules THP1 sont stimulées *in vitro* pendant 4h ou 6h, suivant les expériences, par 2 molécules allergisantes: le 2,4-dinitrochlorobenzène (DNCB, 10 μM) ou le cinnamaldéhyde (CinA, 100 μM) [Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France]. Le DNCB et le CinA sont dilués dans du DMSO 0,1% [Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France] et leur cytotoxicité n'excède pas 30%.

- **Traitement des THP1 par des inhibiteurs pharmacologiques**

Les cellules sont prétraitées ou non pendant 40 min par l'**acide okadaïque** (AO) [Calbiochem, Darmstadt, Allemagne], un inhibiteur des protéines sérines/thréonines phosphatases 2A, 1 et 2B. Les cellules sont prétraitées pendant 30 minutes avec l'AO (150 μM) ou son contrôle DMSO 0,1% puis stimulées pendant 4h avec les différentes molécules chimiques.

Les cellules, avant d'être stimulées par les différentes molécules chimiques sont prétraitées pendant 40 minutes par des **inhibiteurs pharmacologiques spécifiques des MAPK, d'Ikkβ ou de la Caséine Kinase 2 (CK2)**. Les cellules THP1 sont donc prétraitées par le SB203580 [inhibiteur de p38 MAPK] (Calbiochem, Darmstadt, Allemagne), à la concentration de 20 μM; par le SP600125 [inhibiteur de JNK] (Calbiochem, Darmstadt, Allemagne), à 20 μM ; par le PD98059 [inhibiteur de ERK1/2] (Calbiochem, Darmstadt, Allemagne), à 50 μM ; par le BAY 11-7085 [inhibiteur de IKKB] (Calbiochem, Darmstadt, Allemagne), à 3 μM; ou le CX-4945

[inhibiteur de la CK2] (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), à la concentration de 5 μ M. Le SB203580 est reconstitué dans de l'eau ultra-pure tandis que le SP600125, le PD98059, le BAY 11-7085 et le CX-4945 sont reconstitués dans du DMSO tel que la concentration finale de DMSO n'excède pas 0,1%.

2.3. Déphosphorylation des protéines par la lambda phosphatase

Les extraits totaux sont préparés dans un tampon Triton dépourvu de β -glycérophosphate, Na_3VO_4 , et PMSF (cf paragraphe 4). 50 μ g d'extraits protéiques totaux sont incubés avec la Protéine Lambda Phosphatase (Lambda PP P0753S [New England BioLabs, UK]) recombinante à la concentration de 8 UI/ μ g de protéines (activité finale 400 UI/échantillon). La lambda PP est diluée dans un tampon 50 mM tris pH 7,5, 0,1 mM Na_2EDTA , 5 mM dithiothreitol, 2 mM MnCl_2 . Puis les échantillons sont incubés pendant 30 minutes à 30°C et analysés par Western blot.

2.4. Analyse protéique par Western blot

Les protéines totales sont obtenues après lyse des cellules par un tampon de lyse Triton [20 mM Tris pH 7,4 ; 137 mM NaCl ; 2 mM EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) dissodique pH 7,4 ; 1% Triton X-100 ; 25 mM β -glycérophosphate ; 1 mM orthovanadate de sodium (Na_3VO_4) ; 2 mM pyrophosphate de sodium ; 10% glycérol ; 1 mM PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride) ; 1 μ g/ml aprotinine ; 1 μ g/ml leupeptine et 1 μ g/ml pepstatine à 1 μ g/ml]. Les lysats sont ensuite centrifugés à 15000 rpm à 4°C pendant 20 minutes. Les extraits protéiques sont ensuite isolés et dosés par la méthode BCA (Bi-Cinchoninic acid Assay) (Sigma, St Louis, MO). 50 μ g des protéines dénaturées sont séparées sur un gel SDS-PAGE 10% puis transférées sur une membrane de polyvinylidone difluoride (PVDF, Amersham Biosciences, Les Ulis, France). La membrane est saturée avec du TBS (Tris Buffer Saline) 1X supplémenté de 5% lait pendant 1h pour Nrf2, et supplémenté de 3% de BSA (Bovine Serum Albumin) pour Keap1, JNK1, JNK2 et p38 totale. La membrane est ensuite incubée durant toute la nuit à 4°C avec 0,2 μ g de l'Anticorps (Ac) anti-Nrf2 (H-300, Santa Cruz Biotechnology) ; 0,2 μ g de l'Ac anti-Keap1 [Keap1-E20, Santa-Cruz Biotechnology sc-15246], 1 μ g de l'Ac anti-JNK1 [ab7949, Abcam, UK], 0,1 μ g de l'Ac anti-JNK2 [ab76125, Abcam, UK], ou 2 μ g de l'Ac anti-p38 totale (p38 N20, Santa Cruz Biotechnology, Tebu, Le Perray-en-

Yvelines, France) ; la p38 totale est utilisée comme contrôle de charge. Après lavages dans une solution de TBS 1X 0,2% Tween, la membrane est incubée pendant 45 min avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Les protéines d'intérêt sont révélées par chimioluminescence (ECL solution, Amersham Biosciences, Les Ulis, France). L'intensité des bandes obtenues est quantifiée par densitométrie associée à une analyse informatique grâce à un Chemidoc (BioRAD, France). Après chaque révélation, la membrane est déshybridée par une solution de Re-Blot 1X (Millipore, Molsheim, France) afin de révéler d'autres protéines.

2.5. Transfection cellulaire

Les cellules THP1 sont transfectées par électroporation selon les conditions suivantes. Les cellules sont lavées afin d'éliminer le sérum et reprises à 40.10^6 cellules/ml. 4 millions de cellules (volume final de 100 μ l) sont transfectées avec des stealth RNA JNK1 (5 pmol) + stealth RNA JNK2 (5 pmol) (MAPK8 HSS 108547 et MAPK9 HSS 108550, respectivement, Life Technologies) ou stealth RNA contrôles 10 pmol (low GC duplex PN 46-2002 Life Technologies) dans des cuves d'électroporation 0,4 cm (Eurogentec, Seraing, Belgique). Les cuves sont ensuite soumises à un choc électrique (150 μ F, 300 V) à l'aide de l'électroporateur Gene Pulser X cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) puis les cellules sont remises en culture dans du RPMI complet et incubées à 37°C pendant 48h avant d'être stimulées avec les molécules allergisantes.

2.6. Co-immunoprécipitation

Après stimulation, les cellules THP1 sont lysées aussitôt avec le tampon triton décrit ci-dessus. L'anticorps anti-cJun (cell signaling #9165) ou anti-Keap1 (Keap1-E20, Santa-Cruz Biotechnology sc-15246) est ensuite incubé avec 650 μ g de lysats cellulaires pendant 2h sous agitation à 4°C. Puis 25 μ l de billes de protéines G sépharose (GE healthcare 4 fast flow ref 17 0618-01) sont ajoutés et les complexes sont à nouveau incubés sous agitation à 4°C pendant 2h. Les billes sont ensuite lavées 5 fois avec le tampon de lyse triton avec inhibiteurs, comme décrit dans le paragraphe 2.4, puis portées à ébullition pendant 5 min avec du tampon de réduction (Glycérol 40%, Tris pH 6,8 125 mM, SDS 4%, mercaptoéthanol 5%, Bromophénol B 0,025%) afin de récupérer les protéines. Ces dernières sont déposées sur un gel d'acrylamide 10% et le Western-blot est effectué dans les conditions décrites ci-dessus.

2.7. Reverse Transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Le protocole est le même que celui décrit dans l'article de Bourayne *et al.* (soumis dans Journal of Immunology). Les amorces utilisées sont : *ho-1* : [5'-GGCCTGGCCTTCTTCACCTT-3' et 5'-GAGGGGCTCTGGTCCTTG GT-3'], *nqo1* : [5'-GGGCAAGTCCATCCCAACTG-3' et 5'-GCAAGTCAG- GGAAGCCTG GA-3'], *nrf2* : [5'- TGG ACG GGA CTA TTG AAG GCT G-3' et 5'- GCC GCC TTT TCA GTA GAT GGA GG-3'], GAPDH: [5'-CAG CCT CAA GAT CAT CAG CA-3' et 5'- TGT GGT CAT GAG TCC TTC CA-3']; β -actine: [5'-GGC ATC CTC ACC CTG AAG TA-3' et 5'-GCA CAC GCA GCT CAT TGT AG-3'].

2.8. Sondes ARE biotinylées

Après stimulation, les cellules THP1 sont lysées dans un tampon hypertonique constitué de Non-diet P40 (NP40), 20% glycérol, 20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 420 mM NaCl, 1 mM DTT, 1mM orthovanadate de sodium, 1 mM de sodium pyrophosphate, 125 mM acide okadaïque, 62,5 mM EDTA, 40 mM EGTA, 0,5 mM PMSF, 1 g/ml aprotinine, 1 g/ml pepstatine, 1 g/ml leupeptine. Après centrifugation à 15000 rpm et à 4°C pendant 20 min, les oligonucléotides suivants (MWG biotech) sont biotinylés en 5' et hybridés : 5'-biot CAG TCA CAG TGA CTC AGC AGA ATC T-3' et 5'-biot AGA TTC TGC TGA GTC ACT GTG ACT G-3', selon la structure de la séquence ARE du promoteur de NQO-1. Des oligonucléotides mutés sont utilisés comme contrôle de fixation non spécifique : 5'-biot CAG TCA CAG ACT CTC ACG AGA ATC T-3' et 5'-biot AGA TTC TCG TGA GAG TCT GTG ACT G-3'. Les extraits totaux (200 μ g) sont incubés à 4°C pendant 90 minutes avec 2 μ g d'oligonucléotide couplés à 30 μ l de billes de streptavidine-agarose (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Les complexes sont lavés dans du tampon de lyse et élués par ébullition dans du tampon de réduction (Glycérol 40%, 125 mM tris pH 6,8, SDS 4%, mercaptoéthanol 5%, Bromophénol B 0,025%). Les protéines sont ensuite analysées par WB et révélées par les anticorps anti-Nrf2 (H-300, Santa Cruz Biotechnology) et anti-PcJun (Abcam, ab32385). Les lysats totaux (50 μ g) sont également migrés sur gel d'acrylamide 10 % comme contrôles.

2.9. Génération des DC murines issues de la moelle osseuse (BMDC)

Des DC ont été différenciées à partir de progéniteurs de la moelle osseuse de souris C57BL/6. Les progéniteurs issus de la moelle osseuse de fémurs et tibias de souris C57BL/6 ont été récupérés, lavés et mis en culture dans du milieu IMDM complet (IMDMc) contenant

10% de SVF inactivé, 0,1 mg/ml de streptomycine et 100 U/ml de pénicilline, supplémenté de 10% du surnageant GM-CSF (issu de la lignée J558, gracieusement fourni par le Dr S Amigorena, Institut Curie) et de β -mercaptoéthanol (50 μ M, Sigma). Les cellules sont mises en culture à la concentration de 3×10^6 cellules/10 ml d'IMDMc/boîte de Pétri (\varnothing 100, Gosselin, Hazebrouck, France), et 3 jours après, 10 ml d'IMDMc supplémenté de 10% de surnageant de GM-CSF et 50 μ M de β -mercaptoéthanol sont ajoutés à chaque boîte de Pétri. Au jour 7, la moitié du surnageant de culture est récupéré, centrifugé et le culot cellulaire est repris dans 10 ml d'IMDMc frais supplémenté de 10% de surnageant de GM-CSF et 50 μ M de β -mercaptoéthanol /boîte. Au jour 8, les BMDC non-adhérentes et faiblement adhérentes sont récupérées par pipetage et lavées deux fois avant d'être remises en culture à 1×10^6 cellules/ml.

2.10. Transfert adoptif de cellules dendritiques

Au jour 8, les BMDC non-adhérentes et faiblement adhérentes ont été récupérées, lavées deux fois avec de l'IMDMc puis reprises à la concentration de 1×10^6 cellules/ml avec du PBS, prétraitées par du DMSO ou du CX-4945 7,5 μ M pendant 5h. Les BMDCs sont ensuite lavées 2 fois avec de l'IMDMc, comptées puis reprises dans du PBS (pH 7,4) à la concentration de 5×10^6 cellules/ml et chargées avec de l'acide 2,4-dinitrobenzosulfonique (DNBS, 4 mM) pendant 10 minutes à 37°C à l'abri de la lumière. Puis les cellules sont lavées 2 fois avec de l'IMDMc sans SVF, comptées et reprises dans du PBS à la concentration de 3×10^6 cellules/ml. Les souris préalablement rasées sont ensuite sensibilisées au niveau abdominal par deux injections intradermales de deux fois 50 μ l de la solution de DC, soit environ 300 000 DC, réparties en 5 groupes (4 souris/groupe) : PBS, véhicule (DMSO), CX, DNBS et DNBS + CX. Cinq jours plus tard, toutes les souris ont reçu une application de 20 μ l de DNCB 0,5% pour mimer la phase d'élicitation au niveau des 2 côtés de l'oreille. L'épaisseur des oreilles est mesurée 24h, 48h et 72h après l'élicitation à l'aide d'un micromètre (Mitutoyo, Japon). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation de l'épaisseur des oreilles.

2.11. Marquage au PKH26 et cytométrie en flux

Des BMDC ont été marquées au PKH67 (PKH67 Green Fluorescent Cell linker mini kit, Sigma Aldrich Saint Quentin Fallavier, France) dilué au $1/250^{\text{ème}}$ pendant 3 minutes. Du SVF pur est ensuite ajouté pour stopper la réaction. Les cellules sont ensuite lavées, comptées et

remises à 3×10^6 /ml pour être traitées par du CX-4945 (7,5 μ M) ou du DMSO 0,1% comme décrit ci-dessus. Afin d'étudier le devenir des DC injectées, les BMDC traitées avec le CX ou le DMSO ont été injectées à 2 souris pour chaque groupe. Cinq jours après, les ganglions inguinaux, les ganglions auriculaires et les oreilles des souris sont récupérés. Les ganglions sont broyés et le broyat cellulaire est passé au travers d'un tamis (\varnothing 70 μ m). Les oreilles sont digérées sur la nuit par de la dispase (0,2 mg/ml) puis dilacérées et traitées par de la collagénase (1,5 mg/ml) et de la dispase (0,2 mg/ml) pendant 1h30. La suspension cellulaire obtenue est passée au travers d'un tamis (\varnothing 70 μ m). Les cellules ainsi récupérées sont lavées et marquées comme suit : CD11c PeCy7, CMH II Alexa700 et CD45 APC (BD, Biosciences). La mortalité cellulaire est évaluée par un marquage au Zombie Aqua (BioLegend, Ozyme). La lecture a été réalisée sur un cytomètre Fortessa (BD, Biosciences).

3. Résultats

3.1. Nrf2 existe sous une forme phosphorylée

Il a précédemment été montré au sein de notre équipe que Nrf2 s'accumule dans les THP1 en réponse aux molécules allergisantes (Migdal *et al.*, 2013). Comme détaillé précédemment (III.5.4.1.), plusieurs études ont mis en avant que l'activation de Nrf2 mettait en jeu des phénomènes de phosphorylation. Afin de confirmer que l'exposition de cellules de la lignée THP1 à des molécules allergisantes conduit à l'activation de Nrf2 sous une forme phosphorylée, nous avons eu une approche en deux temps en réponse à deux molécules allergisantes organique : le 2,4-dinitrochlorobenzène (DNCB) et le cinnamaldéhyde (CinA).

3.1.1. La Lambda Phosphatase recombinante entraîne la disparition de la bande de plus haut poids moléculaire de Nrf2.

Nrf2 est une protéine s'accumulant sous forme de deux bandes dans les cellules THP1 et les DC. Afin de caractériser ce doublet, nous avons eu une approche *via* une Lambda Phosphatase (LPP) recombinante active sur les résidus sérine, thréonine et tyrosine phosphorylés des protéines. Les cellules THP1 ont été stimulées *in vitro* pendant 4h, temps auquel l'accumulation de Nrf2 est maximale, par le DNCB 10 μ M et le CinA 100 μ M. Les extraits protéiques ont été traités ou non par la LPP. L'accumulation de Nrf2 a ensuite été étudiée par Western blot (WB). Nous montrons que Nrf2 est présent sous forme de 2 bandes aux alentours de 100 kDa dans les cellules THP1 stimulées par le DNCB et le CinA et peu ou pas dans les cellules contrôles (Figure 42a). En présence de la LPP, la bande de plus haut poids moléculaire (PM) disparaît dans les cellules THP1 stimulées par le DNCB et le CinA indiquant l'état phosphorylé de cette bande, au profit d'une intensification de la bande de plus faible PM. Cependant, la quantité totale de Nrf2 dans les cellules stimulées par les molécules sensibilisantes puis traitées par la LPP ne varie pas de manière significative (Figure 42b). Ainsi, en présence, de LPP, la quantité de Nrf2 commute de la forme de haut PM à la forme de faible PM sans que la quantité totale de Nrf2 ne varie. Cela suggère que la forme de haut PM de Nrf2 est phosphorylée.

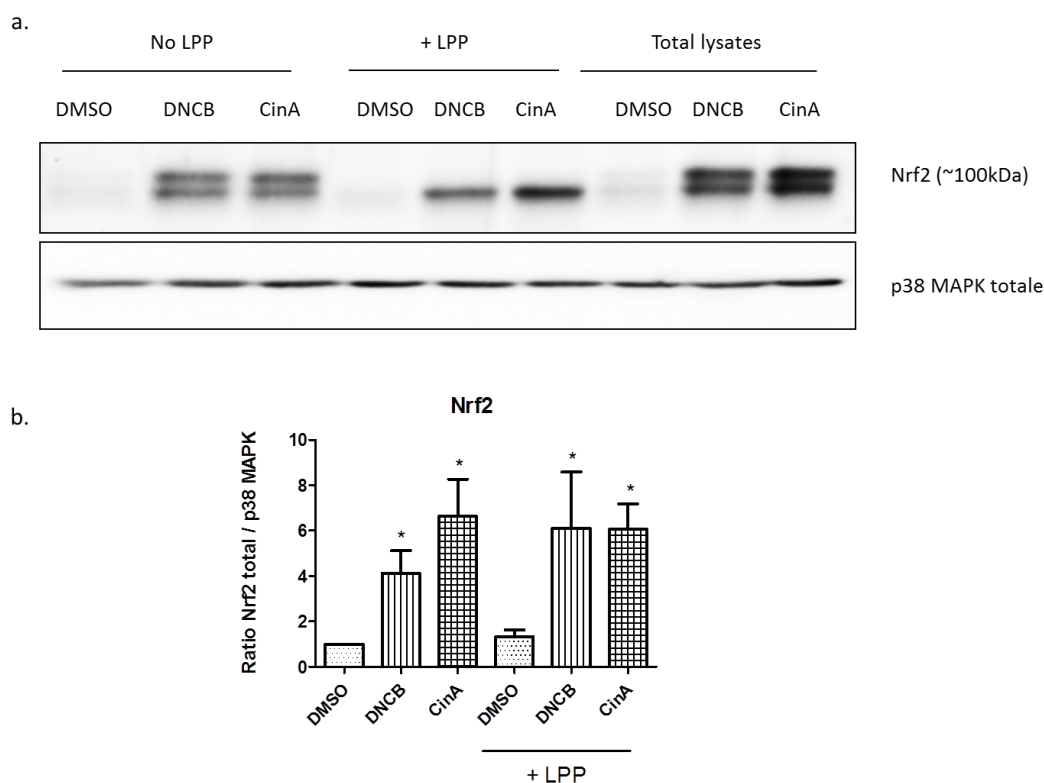


Figure 42. La bande de haut poids moléculaire de Nrf2 est phosphorylée

Des cellules THP1 ont été stimulées pendant 4h avec du DNCB 10 μ M ou du CinA 100 μ M. Les lysats protéiques totaux ont été traités par une λ phosphatase recombinante (LPP), une sérine/thréonine phosphatase (400 UI).

a. L'expression de Nrf2 a été mesurée par Western blot (WB) et analysée par le Chemidoc XRS (Biorad), p38 MAPK totale a été utilisée comme contrôle de charge.

b. Nrf2 total a été quantifié par analyse densitométrique par le logiciel Imagelab (Biorad), les résultats sont exprimés par le *ratio* de l'intensité de Nrf2 corrigé sur l'intensité de la p38 MAPK totale et représentent la moyenne \pm SEM.

Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$ comparé au contrôle DMSO (Test de Mann-Whitney)

3.1.2. L'acide okadaïque exacerbe la phosphorylation de de Nrf2

Pour explorer l'état de phosphorylation des deux formes de Nrf2 (haut PM & faible PM), nous avons prétraité les cellules par de l'acide okadaïque (AO), un inhibiteur des sérines/thréonines phosphatases 2A, 1, et 2B puis stimulées par le DNCB 10 μ M ou le CinA 100 μ M.

Nrf2 s'accumule sous forme de 2 bandes en réponse au DNCB et au CinA. L'inhibition des sérines/thréonines phosphatases 2A, 1, et 2B par l'AO induit une augmentation de l'intensité de la forme de haut PM de Nrf2 et une diminution de la forme de plus faible PM sans

toutefois changer la quantité totale de Nrf2 (Figure 43a et 43b). Cependant, dans les cellules contrôles, l'OA induit l'accumulation de la forme de haut PM de Nrf2, suggérant que l'OA pourrait réagir chimiquement avec les cystéines de Keap1 menant à une accumulation faible de Nrf2 phosphorylé.

Ceci confirme l'existence de Nrf2 sous une forme phosphorylée en réponse aux molécules allergisantes DNCB et CinA dans les cellules THP1, observée à un plus haut PM par WB.

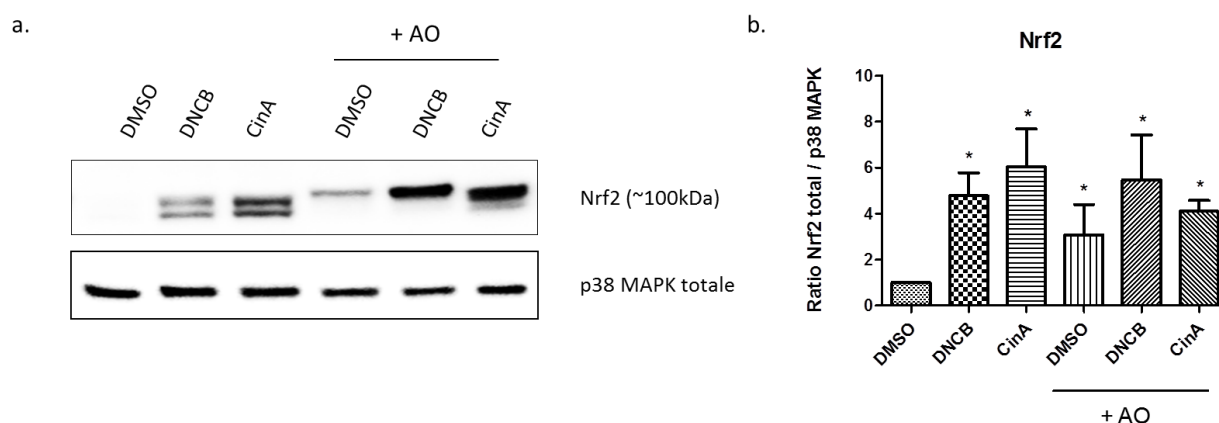


Figure 43. La bande de haut poids moléculaire de Nrf2 est phosphorylée

Des cellules THP1 ont été prétraitées pendant 1h avec l'acide okadaïque (150 nM), un inhibiteur des sérines/thréonines phosphatases, puis stimulées pendant 4h avec du DNCB 10 μ M ou du CinA 100 μ M.

a. L'expression de Nrf2 a été mesurée par WB et analysée par le Chemidoc XRS (Biorad), p38 MAPK totale a été utilisée comme contrôle de charge.

b. Nrf2 total a été quantifié par analyse densitométrique par le logiciel Imagelab (Biorad), les résultats sont exprimés par le *ratio* de l'intensité de Nrf2 corrigé sur l'intensité de la p38 MAPK totale et représentent la moyenne \pm SEM.

Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$ comparé au contrôle DMSO (Test de Mann-Whitney)

3.2. La protéine kinase CK2 est impliquée dans l'activation de la voie Nrf2/Keap1

3.2.1. CK2 ne diminue pas significativement l'accumulation de Nrf2

Apopa *et al.* ont montré que la CK2 assure la phosphorylation directe du domaine de transactivation Neh4 et Neh5 de Nrf2. Cette phosphorylation permet à Nrf2 de transloquer au noyau afin d'activer la transcription de ses gènes cibles en réponse au tert-butylhydroquinone (Apopa *et al.*, 2008). D'autre part, nous avons identifié que la protéine kinase CK2 est activée par les molécules allergisantes et qu'elle joue un rôle important dans l'activation d'une réponse immunitaire (de Bourayne *et al.*, soumis dans JI).

Nous avons donc investigué si la CK2 intervenait dans l'activation de Nrf2 dans des cellules de l'immunité telles que les cellules de la lignée THP1.

Pour ce faire, nous avons prétraité les THP1 pendant 1h avec un inhibiteur pharmacologique spécifique de la CK2, le CX-4945 à 10 μ M puis stimulé pendant 4h avec du DNCB 10 μ M ou du CinA 100 μ M. L'accumulation de Nrf2 a été étudiée par WB (Figure 44).

Nrf2 s'accumule en réponse au DNCB et au CinA. Cependant, lorsque l'activité de la CK2 est inhibée, nous avons obtenu des résultats hétérogènes. De façon surprenante, nous avons deux profils : l'accumulation de Nrf2 est diminuée (Figure 44a) ou alors elle ne varie pas (Figure 44b) dans les cellules prétraitées avec le CX et stimulées par le DNCB et le CinA.

La CK2 ne semble donc pas être indispensable à l'accumulation de Nrf2 dans les THP1 en réponse aux molécules allergisantes. Nous avons effectué une expérience préliminaire en collaboration avec le Dr Andrea Haase (Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin) pour étudier si l'inhibition de l'activité de la CK2 modifie le profil de phosphorylation de Nrf2 en réponse au DNCB par une approche de gel 2D (Figure 45).

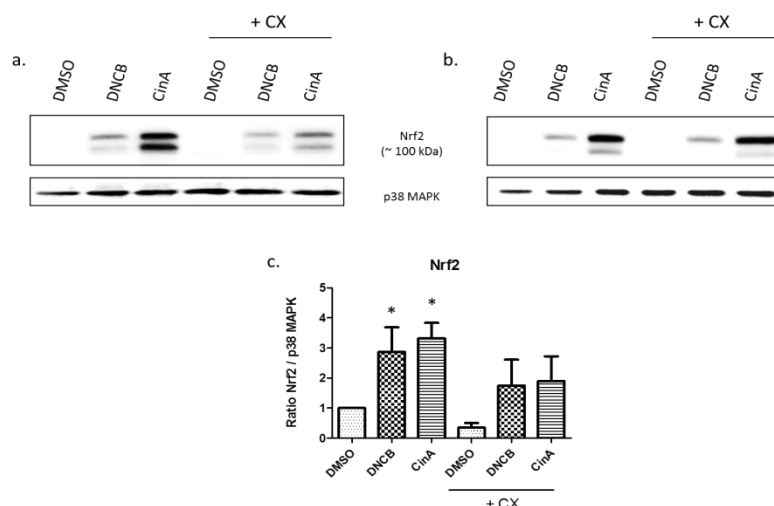


Figure 44. La CK2 ne contrôle pas l'accumulation de Nrf2

Des cellules THP1 ont été prétraitées pendant 1h avec le CX-4945 (10 μ M), un inhibiteur de l'activité de la CK2, puis stimulées pendant 4h avec du DNCB 10 μ M ou du CinA 100 μ M.

a. et b. L'expression de Nrf2 a été mesurée par WB et analysée par le Chemidoc XRS (Biorad), p38 MAPK totale a été utilisée comme contrôle de charge.

c. Nrf2 total a été quantifié par analyse densitométrique par le logiciel Imagemag (Biorad), les résultats sont exprimés par le *ratio* de l'intensité de Nrf2 corrigé sur l'intensité de la p38 MAPK totale et représentent la moyenne \pm SEM. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$ comparé au contrôle DMSO (Test de Mann-Whitney)

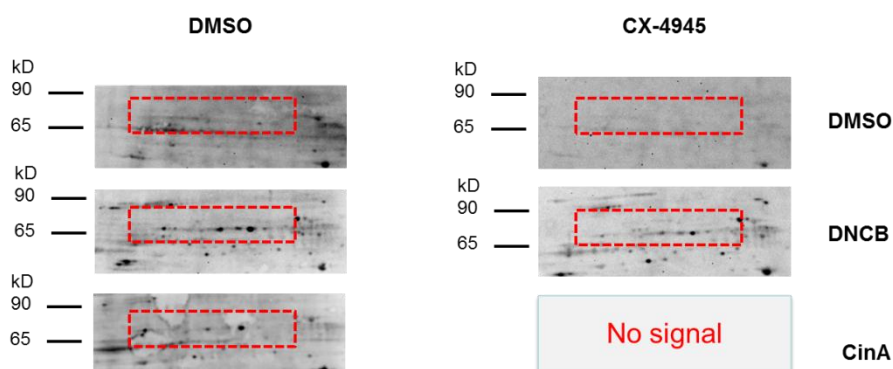


Figure 45. La CK2 ne phosphoryle pas Nrf2

Des cellules THP1 ont été prétraitées pendant 1h avec le CX-4945 (10 μ M), inhibiteur de l'activité de la CK2, puis stimulées pendant 4h avec du DNCB 10 μ M ou du CinA 100 μ M. Les cellules ont été lysées dans un tampon 2D-PAGE (7M urée, 2M thiourée, 4% CHAPS, pharmalytes pH 3-10 2%, réactif Destreak 1,2% Spermine 0,7%, inhibiteur de protéases 1%), centrifugées à 14000 rpm pendant 1h et les surnageants déposés sur les bandes IPG 24 cm avec le système Ettan IPGPhor3 Isoelectric focusing system (GE Healthcare) pour la séparation par le point isoélectrique. Les gels de polyacrylamide 2D ont été coulés manuellement et l'électrophorèse réalisée par le système Ettan DALTtwelve second-dimension gel electrophoresis system (GE Healthcare). Les gels sont ensuite colorés avec du Ruthenium II tris et photographiés par l'appareil Typhoon, FLA 9500 imager (GE Healthcare).

Nous observons que le DNCB et le CinA induisent bien des spots de phosphorylation en comparaison au DMSO. De plus, le profil de phosphorylation est différent entre les 2 molécules. En l'absence de l'activité de la CK2 et en réponse au DNCB, l'intensité des spots est plus faible certainement due à une diminution de la quantité de Nrf2, mais le profil est identique à celui en présence de la CK2. Aucun signal n'est détecté dans les cellules prétraitées avec le CX-4945 et stimulées avec le CinA. Soit nous avons une inhibition de l'expression de Nrf2, soit il y a eu un artefact de manipulation. L'expérience est à répéter afin de confirmer l'effet observé pour le DNCB et savoir si l'absence de signal en réponse au CinA serait dû à un artefact ou à une réelle inhibition.

3.2.2. CK2 contrôle l'expression génique de gènes cibles de Nrf2

Il semble donc que la CK2 ne phosphoryle pas directement Nrf2 en réponse au DNCB. Nos résultats montrent que la CK2 ne contrôle pas l'accumulation de Nrf2, mais pourrait jouer un rôle dans son activation transcriptionnelle. Nous avons donc étudié l'expression de l'ARNm de *nrf2* lui-même car il a la capacité de s'auto-transcrire (Kwak *et al.*, 2002) ainsi que de deux gènes cibles de Nrf2 : *ho-1* et *nqo-1* par RT-qPCR.

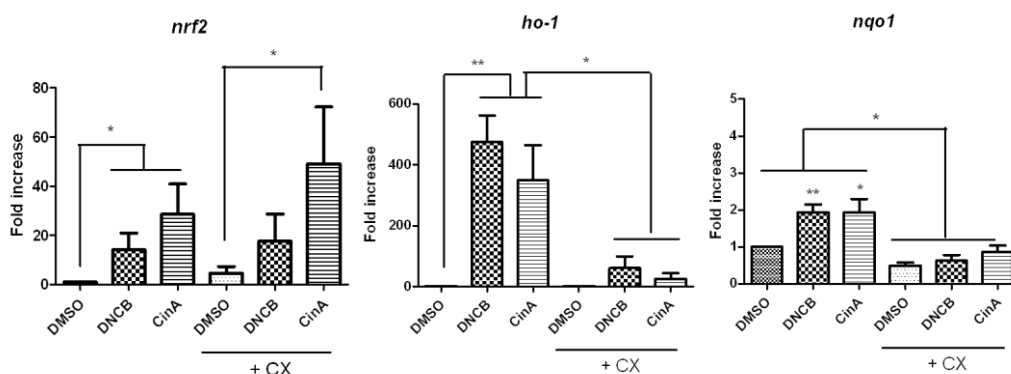


Figure 46. La CK2 contrôle l'accumulation des gènes cibles de Nrf2

Des cellules THP1 ont été prétraitées pendant 1h avec le CX-4945 (10 μ M), un inhibiteur de l'activité de la CK2, puis stimulées pendant 6h avec du DNCB 10 μ M ou du CinA 100 μ M.

L'expression des ARNm de *nrf2*, *ho-1* et *nqo-1* a été mesurée par RT-qPCR. L'expression des ARNm a été mesurée avec le logiciel Biorad SFX Manager et les data a été analysée par la méthode du delta-delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct). Les résultats sont exprimés en facteurs d'induction comparés au contrôle DMSO (i.e. ratio of $(1+E)^{-\Delta\Delta$ Ct des cellules traitées / $(1+E)^{-\Delta\Delta$ Ct des cellules contrôles).

Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

* $p < 0,05$ comparé au DMSO; ** $p < 0,01$ comparé au DMSO (Test de Mann-Whitney)

Comme le montre la figure 46, l'expression de l'ARNm codant pour *nrf2* est augmentée en réponse au DNCB et au CinA mais n'est pas modifiée en l'absence de la CK2. Bien que l'activation de Nrf2 soit essentiellement médiée par sa stabilisation protéique, Nrf2 peut également être néo-synthétisé et a la capacité de s'auto-transcrire (Baird and Dinkova-Kostova, 2011). Le traitement des THP1 par le DNCB ou le CinA entraîne la transcription de *ho-1* et *nqo-1*, fortement diminuée en l'absence de l'activité de la CK2. La CK2 semble donc être une kinase importante dans l'activation transcriptionnelle de Nrf2.

Nous avons ensuite formulé l'hypothèse que l'inhibition de la CK2 pourrait empêcher la translocation nucléaire de Nrf2 et expliquerait l'inhibition transcriptionnelle. Des extraits noyaux-cytoplasmes ont montré que l'inhibition de la CK2 ne modulait pas la présence de Nrf2 dans le noyau en réponse au DNCB et au CinA (résultats non montrés).

Ainsi, la CK2 joue un rôle important non pas dans la stabilisation de la protéine Nrf2, mais dans sa capacité à assurer la transcription de ses gènes cibles.

A ce jour, nous n'avons pas encore élucidé le rôle exact de la CK2 dans l'activation de la voie Nrf2/Keap1. Son implication est certaine car elle est indispensable à la transcription des gènes cibles de Nrf2. Par ailleurs, l'inhibition de l'activité de la CK2 dans les THP1 conduit à une forte diminution des gènes cibles de Nrf2, reproduisant ainsi l'effet de l'absence de *nrf2* chez les souris *nrf2*^{-/-}.

En parallèle, l'inhibition de l'activité de la CK2 dans les MoDC augmente la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-6 (de Bourayne *et al*, soumis dans JI). Afin d'investiguer le rôle de la CK2 dans la réponse inflammatoire, nous avons étudié les conséquences de l'inhibition de la CK2 dans les DC dans un modèle murin d'HSC chez des souris C57Bl/6.

3.3. L'inhibition de la CK2 dans les DC murines conduit à une exacerbation de la réponse inflammatoire (réalisé en collaboration avec Zeina El Ali)

Pour étudier l'effet de l'inhibition de l'activité de la CK2 dans les DC en réponse aux molécules allergisantes, nous avons réalisé des transferts adoptifs de BMDC selon 5 conditions : un groupe PBS, un groupe véhicule (DMSO), un groupe CX, un groupe DNBS et un groupe DNBS + CX.

Les souris ont été ensuite sensibilisées au niveau abdominal par une injection intra-dermale de la solution de DC, selon les 5 conditions ci-dessus (4 souris/condition). Cinq jours plus tard, pour mimer la phase d'éllicitation, toutes les souris (y compris celles qui ont reçu une injection de PBS) ont reçu une application de DNCB 0,5% (Figure 47) au niveau des 2 oreilles. L'épaisseur des oreilles est mesurée 24h, 48h et 72h après l'éllicitation ; les résultats sont résumés dans la figure 47.

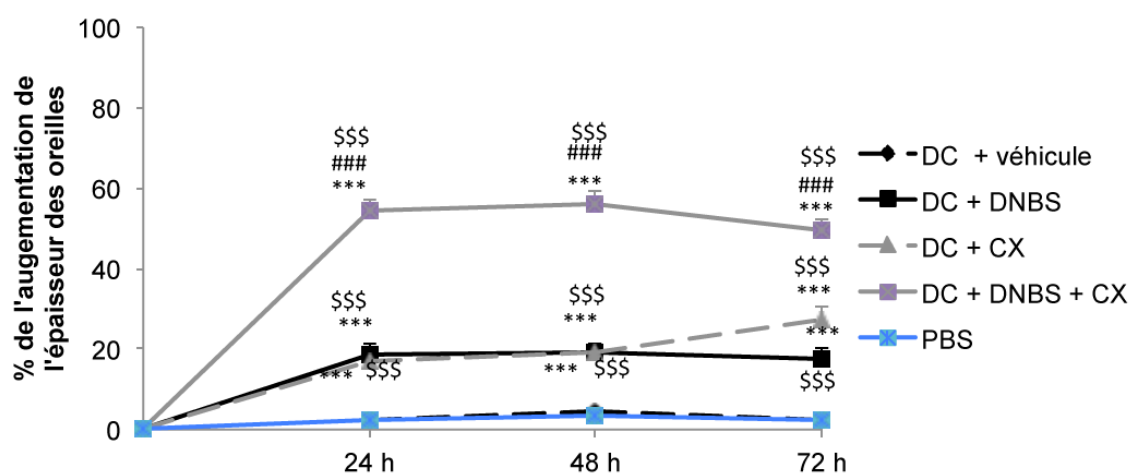


Figure 47. La CK2 contrôle la réponse inflammatoire

Des BMDC ont été prétraitées avec le CX-4945 (7,5 μ M) ou son contrôle DMSO 0,1%, puis chargées ou non avec du DNBS 4mM avant d'être injectées en intra-dermal au niveau du flanc des souris C57BL/6 pour mimer la sensibilisation. Cinq jours après, les souris sont élicitées avec une application de DNCB 0,5% au niveau des deux oreilles et l'épaisseur des oreilles est mesurée 24h, 48h et 72h après élicitation. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation de l'épaisseur des oreilles : $[(\text{moyenne de l'épaisseur des deux oreilles (24h, 48h ou 72h après élicitation)} - \text{moyenne de l'épaisseur des 2 oreilles mesurée avant élicitation}) / (\text{moyenne de l'épaisseur des 2 oreilles mesurée avant élicitation})] \times 100$. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de l'épaisseur des oreilles (4 souris/condition). Les souris contrôles (PBS) ont reçu une injection de PBS à J0 mais ont reçu l'application de DNCB 0,5% cinq jours après l'injection.

*** $p < 0,001$ (versus DC + DMSO) ; ### $p < 0,001$ (versus DC + CX) ; \$\$\$ $p < 0,001$ (versus PBS) (Test de Mann-Whitney)

L'injection de PBS ainsi que de BMDC non chargées, c'est-à-dire prétraitées avec le véhicule DMSO (BMDC 'véhicule'), n'induit pas de gonflement de l'oreille après l'éllicitation des souris.

Les souris ayant reçu une injection de BMDC traitées avec le DNBS (BMDC 'DNBS') et élicitées par du DNCB développent une HSC caractérisée par un gonflement de l'oreille significatif (Figure 47) (El Ali *et al.*, 2013).

L'injection de BMDC traitées avec le CX (BMDC 'CX') sans être stimulées par l'allergisant induit une augmentation de l'épaisseur de l'oreille après élicitation, d'intensité égale à celle induite par les souris sensibilisées par des BMDC 'DNBS', témoignant d'une inflammation en l'absence de contact avec une molécule allergisante. Celle-ci est comparable à celle obtenue par le groupe BMDC 'DNBS'.

Les souris ayant reçu une injection de BMDC 'CX + DNBS' développent une HSC exacerbée en comparaison avec celles qui ont reçu l'injection de BMDC 'DNBS' ou les BMDC 'CX'. La différence d'augmentation de l'épaisseur de l'oreille entre les souris sensibilisées par les BMDC 'CX + DNBS' et les BMDC 'DNBS' semble due à un double effet inflammatoire : celui du DNBS ajouté à celui du CX.

Le profil de l'HSC développée chez les souris ayant reçu l'injection de BMDC 'CX + DNBS' se rapproche donc du profil observé chez les souris *nrf2*^{-/-} après sensibilisation et élicitation par l'allergisant (El Ali *et al.*, 2013).

Des résultats préliminaires montrent que l'absence de l'activité de la CK2 dans les BMDC tend à augmenter l'expression de l'ARNm de *l'il-1β* en réponse au DNCB, et de *l'il-1β*, du *tnfα* et de *l'il-6* dans les cellules contrôles (Figure 48). Ces BMDC dont la CK2 est inactive ont un profil similaire aux BMDC *nrf2*^{-/-}.

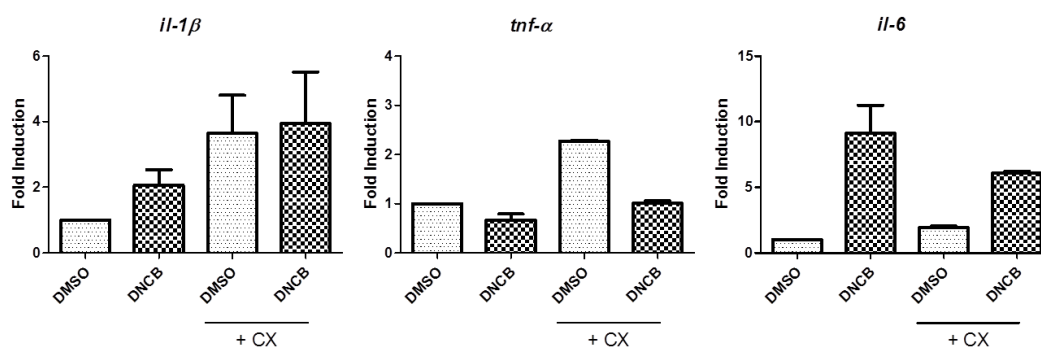


Figure 48. La CK2 semble contrôler l'expression des ARNm de cytokines pro-inflammatoires

Des BMDC ont été prétraitées pendant 1h avec le CX-4945 (10 μ M), un inhibiteur de l'activité de la CK2, puis stimulées pendant 6h avec du DNCB 10 μ M.

L'expression des ARNm d'*il-1β*, *tnfα* et *il-6* a été mesurée par RT-qPCR. L'expression des ARNm a été mesurée avec le logiciel Biorad SFX Manager et les data a été analysée par la méthode du delta-delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct). Les résultats sont exprimés en facteurs d'induction comparés au contrôle DMSO (i.e. ratio of (1+E) $\Delta\Delta$ Ct des cellules traitées / (1+E) $\Delta\Delta$ Ct des cellules contrôles).

Ces résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.

Par la suite, nous avons réalisé une expérience préliminaire afin de caractériser le devenir de ces BMDC injectées aux souris. Des BMDC inactivées pour la CK2 ou non et marquées au PKH67 ont été injectées aux souris. Le PKH67 est un marqueur présentant une fluorescence stable dans le temps et permettant de localiser les cellules marquées *in vivo*. Les cellules isolées à partir des ganglions inguinaux et auriculaires ainsi que des oreilles (cf matériels et méthodes) sont marquées et analysées par cytométrie en flux.

L'analyse des cellules isolées à partir des ganglions auriculaires et inguinaux n'ont pas révélé la présence de BMDC marquées au PKH67 (data non montrées). Cependant, il semblerait qu'une faible quantité soit présente dans les oreilles des souris qui ont reçu l'injection de BMDC traitées par le CX, comme le témoigne la présence de cellules CMH II⁺/PKH67⁺ (Figure 49).

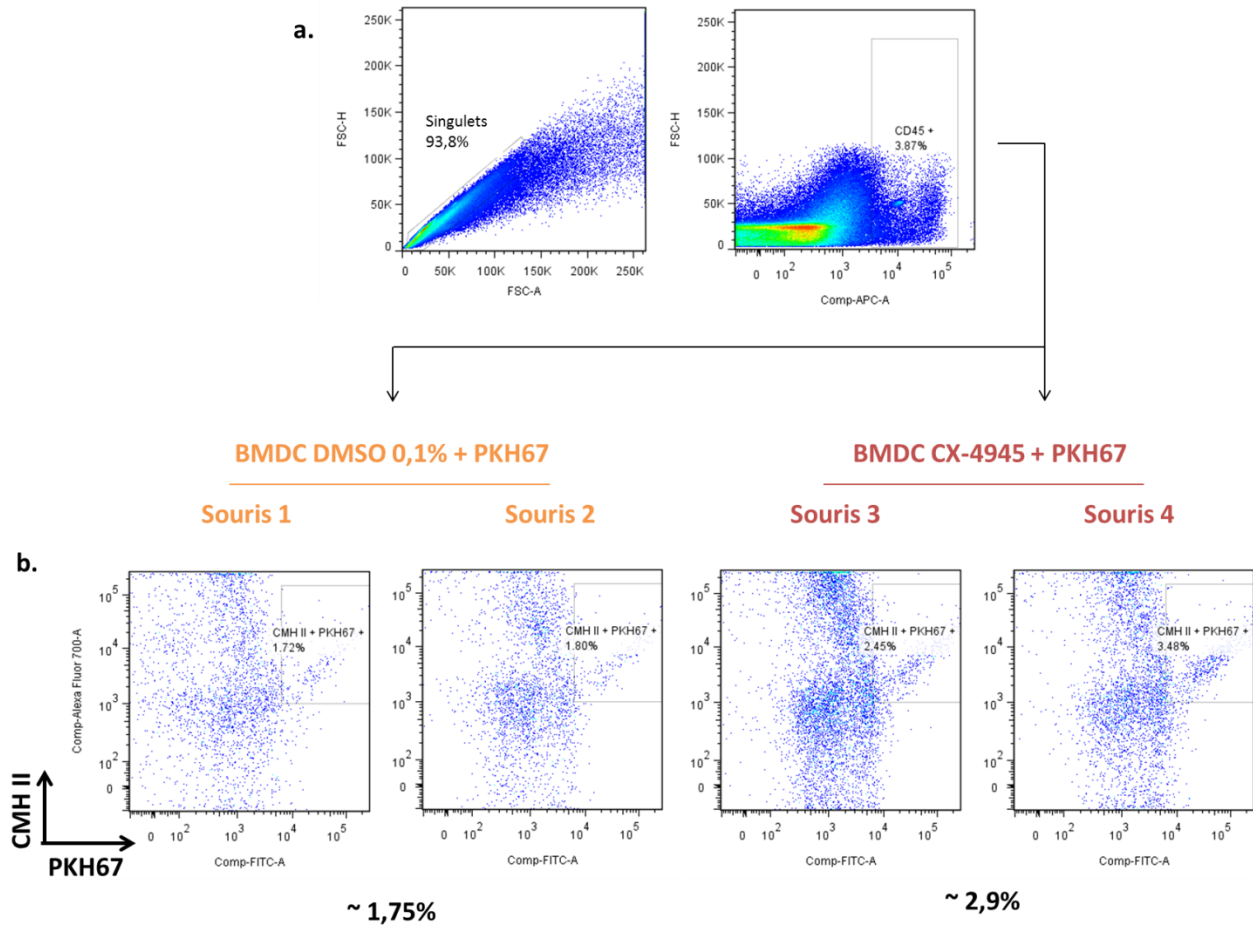


Figure 49. Les BMDC traitées par le CX puis injectées aux souris sont retrouvées au niveau des oreilles

Des BMDC ont été prétraitées pendant 5h avec le CX-4945 (7,5 μ M), ou par le DMSO 0,1% puis marquées par du PKH67 (FITC) 1/250 avant d'être injectées à 2 souris/condition. Cinq jours après, les souris sont sacrifiées et les oreilles sont récupérées, digérées et broyées. Les cellules récupérées sont marquées avec du CD45 APC et du CMH II Alexa 700. L'analyse est faite par cytométrie en flux sur un LSR Fortessa. L'analyse est réalisée sur le logiciel FlowJo.

a. Les cellules singulets sont tout d'abord sélectionnées, puis les cellules hématopoïétiques CD45 sont sélectionnées dans cette population. L'analyse est donc réalisée sur la population CD45⁺

b. Les graphes représentent les cellules CMH II Alexa 700 et PKH67 FITC. Seules les cellules doubles positives CMH II⁺/PKH67⁺ sont quantifiées.

Le résultat préliminaire laisse penser que l'inactivation de la CK2 pourrait participer à une meilleure migration des DC au niveau cutané.

Cependant, de nombreuses expériences restent à réaliser. Il est possible que l'inhibition de la CK2 dans les BMDC induise un profil similaire à celui des BMDC *nrf2* KO, et pourrait alors participer à l'exacerbation de la réponse inflammatoire en réponse aux molécules allergisantes. L'inhibition de l'expression d'HO-1 *via* l'inhibition de l'activité de la CK2

pourrait participer à la prolifération des LT CD4⁺ et/ou CD8⁺, populations jouant un rôle important dans l'EAC.

En parallèle de ce travail, un autre objectif a été de caractériser l'activation de Nrf2 en réponse aux molécules allergisantes, et de tenter d'identifier son partenaire transcriptionnel. Pour cette étude des mécanismes moléculaires et biochimiques de l'activation de la voie Nrf2/Keap1, nous avons fait le choix de travailler sur la lignée cellulaire THP1 pour un accès aux cellules facile et illimité et nous avons fait le choix de travailler sur un seul haptène, le CinA, meilleur inducteur de l'accumulation de Nrf2 que le DNCB.

3.4. La kinase JNK contrôle-t-elle l'accumulation de Nrf2 ?

Nrf2 étant présent sous une forme phosphorylée, nous avons voulu investiguer quelles kinases, outre la CK2, étaient potentiellement mises en jeu. Pour ce faire, nous avons eu une approche par des inhibiteurs pharmacologiques. Sachant que les molécules allergisantes activent la voie des MAPK et NF- κ B nécessaires à l'acquisition d'un phénotype mature dans les DCs, nous avons étudié l'effet de l'inhibition de ces kinases sur l'accumulation de Nrf2 par WB.

Les cellules de la lignée THP1 ont été prétraitées pendant 45 minutes par du SB203580 (inhibiteur de p38 MAPK), du PD98059 (inhibiteur d'Extra-Regulated Kinase [ERK]), du Bay-11 7085 (inhibiteur d'IKK β et donc *in fine* de la voie NF- κ B) ou du SP600125 (inhibiteur de c-Jun N-terminal Kinase [JNK]) avant de stimuler pendant 4h avec du DNCB 10 μ M ou du CinA 100 μ M. L'accumulation de Nrf2 a été étudiée par WB.

Nrf2 ne s'accumule pas dans les cellules contrôles excepté en présence du Bay, c'est-à-dire lorsque la voie NF- κ B est inhibée. Ceci est en accord avec Li *et al* qui ont montré l'effet antagoniste de NF- κ B sur Nrf2 (Li *et al.*, 2008). Nrf2 s'accumule en réponse au DNCB et au CinA. L'accumulation de Nrf2 est quasiment totalement inhibée en présence du SP600125, c'est-à-dire lorsque la voie JNK est inhibée en réponse au CinA (Figure 50).

Ces résultats suggèrent que la kinase JNK participe à l'activation de Nrf2.

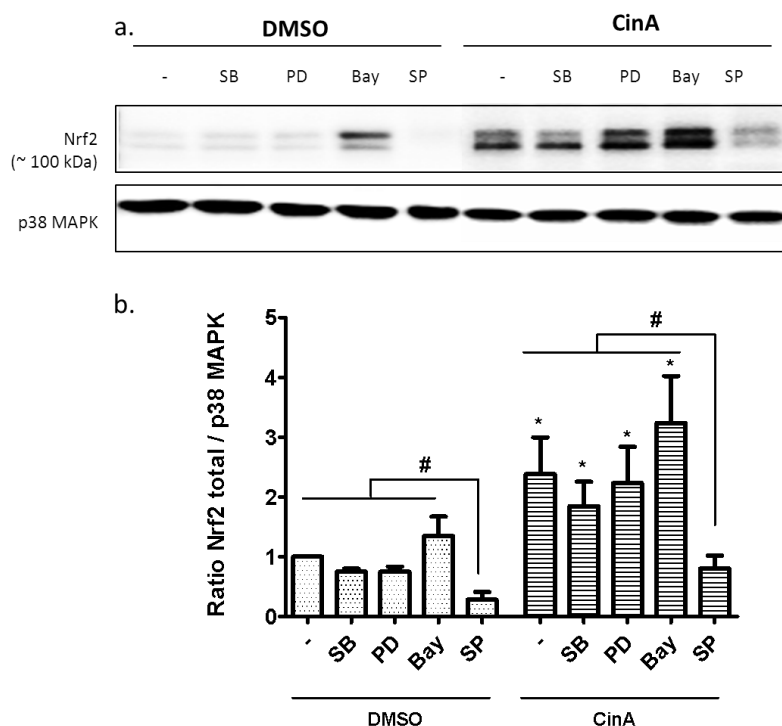


Figure 50. La kinase JNK semble contrôler l'accumulation de Nrf2

Des cellules THP1 ont été prétraitées pendant 1h avec l'inhibiteur de p38 MAPK SB203580 (SB, 20 μ M), l'inhibiteur d'ERK PD98059 (PD, 50 μ M), l'inhibiteur de la voie NF- κ B Bay 11-7085 (Bay, 3 μ M), ou l'inhibiteur de JNK SP600125 (SP, 20 μ M) puis stimulées pendant 4h avec du CinA 100 μ M.

a. L'expression de Nrf2 a été mesurée par WB et analysée par le Chemidoc XRS (Biorad), p38 MAPK totale a été utilisée comme contrôle de charge.

b. Nrf2 total a été quantifié par analyse densitométrique par le logiciel Imagelab (Biorad), les résultats sont exprimés par le *ratio* de l'intensité de Nrf2 corrigé sur l'intensité de la p38 MAPK totale et représentent la moyenne \pm SEM.

Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$ comparé au contrôle DMSO, # $p < 0,05$ comparé aux conditions indiquées (Test de Mann-Whitney)

Par ailleurs, les kinases PI3K et PKC sont également décrites comme régulant positivement l'accumulation de Nrf2, tandis que la GSK3 β la régule négativement (Cf III.5.4.1.). Le rôle de ces kinases dans notre modèle a été également adressé en réponse à un allergisant tel que le CinA. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques LY294002 (inhibiteur de PI3K), PKCi (inhibiteur de PKC) et SB415286 (inhibiteur de GSK3 β) montre que l'inhibition de PI3K entraîne une diminution de l'accumulation de Nrf2 et l'inhibition de la GSK3 β entraîne une augmentation de l'accumulation de Nrf2 (Figure 51). L'inhibition de la PKC ne semble pas moduler l'expression protéique de Nrf2.

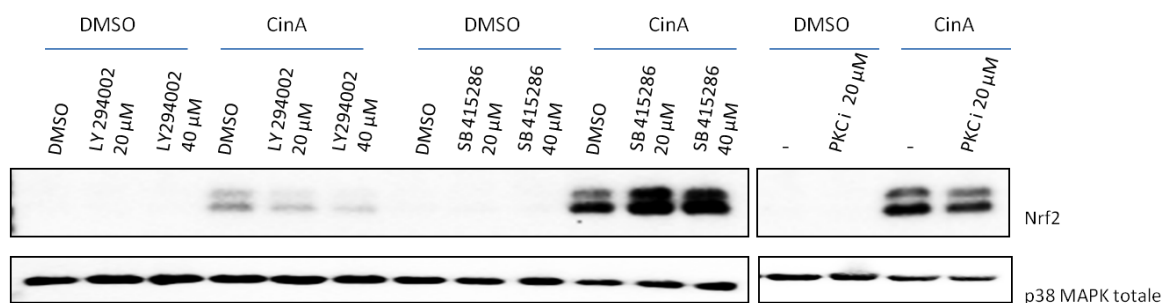


Figure 51. D'autres kinases régulent l'accumulation de Nrf2

Des cellules THP1 ont été prétraitées pendant 1h avec l'inhibiteur de PI3K LY294002 (20 μM), l'inhibiteur de la PKC, PKCi (20 μM), l'inhibiteur de GSK3β SB415286 (20 μM) puis stimulées pendant 4h avec du CinA 100 μM.

L'expression de Nrf2 a été mesurée par WB et analysée par le Chemidoc XRS (Biorad), p38 MAPK totale a été utilisée comme contrôle de charge.

Ces résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.

Ces résultats montrent que la PI3K participe à l'activation de Nrf2 et la GSK3β exerce un contrôle négatif sur l'activation de Nrf2 en réponse au CinA, confirmant ainsi les *data* de la littérature, décrites en réponse à des antioxydants tels que le tBHQ. Cependant, la PKC ne semble pas indispensable à l'accumulation de Nrf2 en réponse au CinA dans les THP1.

JNK nous a semblé être un bon candidat dans l'activation de Nrf2 pour deux raisons : son inhibition entraîne une quasi extinction de l'accumulation de Nrf2, et il est décrit par ailleurs que c-Jun, substrat principal de JNK, est capable de s'hétérodimériser avec Nrf2. Cet hétérodimère permet la transcription des gènes cibles de Nrf2 (Levy *et al.*, 2009; Park and Kim, 2014).

3.5. Nrf2 est lié à Keap1 en réponse au CinA

Nous avons tout d'abord caractérisé le complexe Nrf2/Keap1 en réponse au CinA et étudié l'effet du SP600125 sur ce complexe. Pour cela, nous avons inhibé JNK puis stimulé les THP1 par du CinA avant d'immunoprécipiter Keap1. Les lysats protéiques totaux sont utilisés comme contrôles.

Nrf2 s'accumule dans les lysats totaux en réponse au CinA et son expression est diminuée en l'absence de JNK (cellules prétraitées par du SP600125), l'intensité de la bande de plus haut PM étant particulièrement diminuée (Figure 52). Dans les échantillons immunoprécipités, en

réponse au CinA, on remarque que Nrf2 interagit avec Keap1. Nrf2 interagit également avec Keap1 dans les cellules prétraitées avec le SP, mais plus faiblement, et seule la bande de faible PM est impliquée.

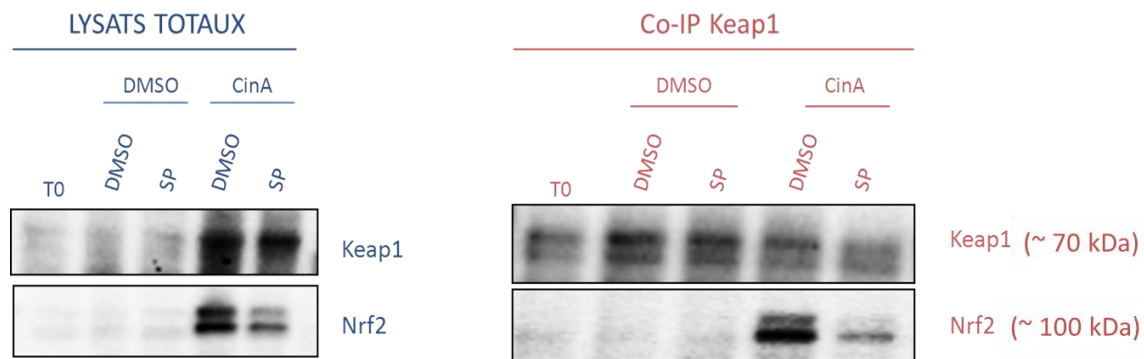


Figure 52. Nrf2 est complexé à Keap1 en absence et en présence de JNK

Des cellules THP1 ont été prétraitées pendant 1h avec l'inhibiteur de JNK SP600125 (SP, 20 μ M) puis stimulées pendant 4h avec du CinA 100 μ M. Keap1 a été immunoprécipité en incubant les lysats protéiques totaux (650 μ g) pendant 2h avec un anticorps anti-Keap1 puis avec des billes sépharose G. Après ébullition en tampon réducteur, les extraits protéiques ont été analysés par WB. Les lysats protéiques totaux ont été utilisés comme contrôles. Ces résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.

L'inhibition de JNK diminue l'état de phosphorylation de Nrf2 mais ne semble donc pas altérer l'interaction de Nrf2 et Keap1 en réponse au CinA. Le complexe ne semble donc pas être le même en présence ou non d'une activité JNK.

3.6. Nrf2 et c-Jun se fixent aux séquences ARE en réponse au CinA

Nous avons émis l'hypothèse que l'effet de JNK sur Nrf2 pouvait passer par c-Jun. Nous avons tout d'abord étudié si c-Jun a la capacité de se fixer aux séquences ARE en réponse au CinA. Pour cela, nous avons eu une approche par des sondes ARE biotinylées. Des sondes mutées (AREm) ont été utilisées en parallèle pour vérifier la spécificité de fixation. Les lysats protéiques totaux sont utilisés comme contrôles. Nrf2 s'accumule en réponse au CinA et se fixe aux séquences ARE (Figure 53). Nous montrons que c-Jun s'accumule sous une forme active phosphorylée (P c-Jun) en réponse au CinA et se fixe également aux séquences ARE (Figure 53).

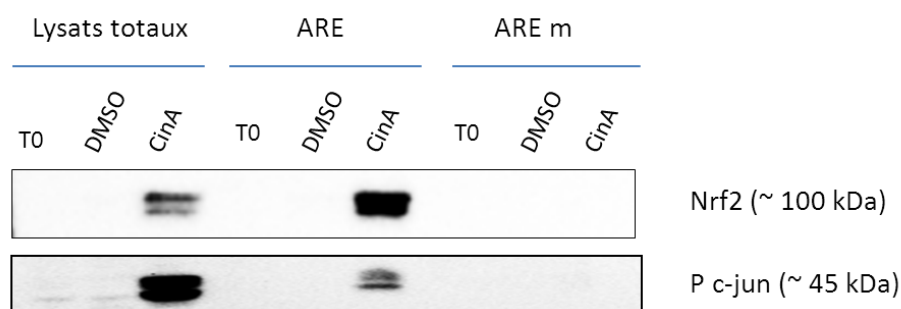


Figure 53. Nrf2 et Phospho c-Jun fixent les séquences ARE en réponse au CinA

Des cellules THP1 ont été stimulées pendant 4h avec du CinA 100 μ M. Les lysats totaux (200 μ g) ont été incubés avec 2 μ g d'oligonucléotides de séquences ARE couplés à 30 μ l de billes de streptavidine-agarose. Après ébullition en tampon réducteur, les extraits protéiques ont été analysés par western blot. Les lysats totaux ont été utilisés comme contrôles.

Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Le complexe Nrf2/c-Jun serait alors important dans l'activité transcriptionnelle de Nrf2. Ces résultats suggèrent que c-Jun serait un des partenaires d'hétérodimérisation possibles de Nrf2.

3.7. Nrf2 n'est pas fixé à c-Jun en réponse au CinA mais en réponse au DNCB

Nrf2 et c-Jun fixant les ARE en réponse au CinA, nous avons émis l'hypothèse que c-Jun et Nrf2 interagissent pour fixer les séquences ARE. Nous avons stimulé des THP1 pendant 4h par du CinA puis réalisé une immunoprécipitation de c-Jun et révélé P c-Jun et Nrf2 (Figure 54).

c-Jun est plus fortement exprimé en réponse au CinA dans les lysats totaux et la quantité de c-Jun immunoprécipité est nettement plus importante dans les cellules stimulées par du CinA. c-Jun est présent sous une forme phosphorylée et donc active seulement dans les cellules stimulées par le CinA. Nrf2 s'accumule dans les lysats totaux dans les cellules stimulées mais n'est pas co-immunoprécipité avec c-Jun. Ces résultats suggèrent donc que c-Jun n'interagit pas avec Nrf2 après 4h de stimulation par le CinA.

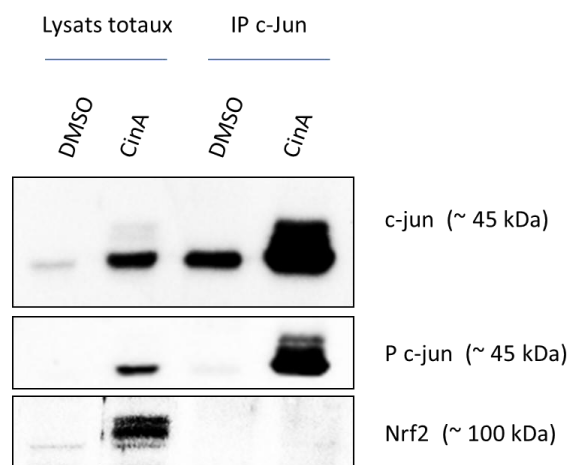


Figure 54. Nrf2 n'est pas complexé à c-Jun en réponse au CinA

Des cellules THP1 ont été stimulées pendant 4h avec du CinA 100 μ M. c-Jun a été immunoprécipité en incubant les lysats protéiques totaux (650 μ g) pendant 2h avec un anticorps anti-c-Jun puis avec des billes sépharose G. Après ébullition en tampon réducteur, les extraits protéiques ont été analysés par western blot. Les lysats protéiques totaux (50 μ g) ont été utilisés comme contrôles.

Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Nous avons réalisé le même travail dans des cellules stimulées avec du DNCB (Figure 55). Des THP1 ont été traitées pendant 4h avec du DNCB et une immunoprécipitation de c-Jun a été réalisée sur les lysats protéiques totaux. Il s'agit d'une expérience préliminaire, et la quantité de protéines était insuffisante pour migrer les lysats totaux en parallèle. Seuls les contrôles des protéines au contact des billes en l'absence d'anticorps ont été réalisés et donc présentés ici.

Etonnamment, la quantité de c-Jun immunoprécipité est identique dans les cellules traitées au DMSO et celles traitées par du DNCB (Figure 55). De plus, on observe que Nrf2 est co-immunoprécipité dans les cellules contrôles et dans les cellules stimulées par le DNCB. Il existe un taux basal de Nrf2 peu ou pas actif dans la cellule, qui est difficilement détectable par WB dans 50 μ g de protéines. En effet, les expériences de co-immunoprécipitation nécessitant environ 650 μ g de protéines, Nrf2 à l'état basal est en quantité suffisante pour être observé par WB.

La quantité de Nrf2 complexé à c-Jun dans les cellules contrôles est plus faible et seule la bande de faible PM, c'est-à-dire hypo-phosphorylée, est présente. En réponse au DNCB, on observe la présence des 2 bandes de Nrf2 co-immunoprécipité.

Cette expérience préliminaire reste critiquable car la présence de Nrf2 importante dans les cellules contrôles laisse penser à une activation excessive des THP1 à l'état basal. Cette expérience est à renouveler avec les lysats totaux analysés en parallèle mais suggère qu'en réponse au DNCB, Nrf2 sous sa forme active phosphorylée interagit avec c-Jun.

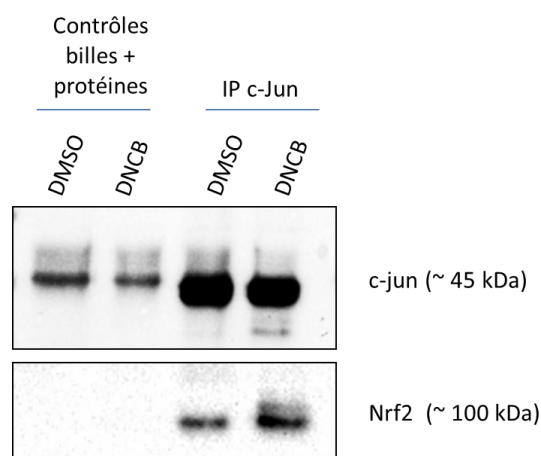


Figure 55. Nrf2 est complexé à c-Jun en réponse au DNCB

Des cellules THP1 ont été stimulées pendant 4h avec du CinA 100 μ M. c-Jun a été immunoprécipité en incubant les lysats protéiques totaux (650 μ g) pendant 2h avec un anticorps anti-c-Jun puis avec des billes sépharose G. Après ébullition en tampon réducteur, les extraits protéiques ont été analysés par western blot. Les lysats protéiques totaux incubés avec les billes en l'absence d'anticorps ont été utilisés comme contrôles.

Ces résultats sont représentatifs d'une expérience.

Ces datas soulignent que les molécules allergisantes semblent activer de manière différente la voie Nrf2, et que les partenaires transcriptionnels de Nrf2 varient selon la molécule.

3.8. Le SP600125 diminue l'activité de la CK2

L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ne peut permettre une étude précise de la kinase cible du fait de leur manque de spécificité. Une étude a montré que le SP600125 inhibait JNK mais également 13 autres kinases sur 30 testées (Bain *et al.*, 2007), mettant ainsi en avant le manque de spécificité du SP600125. L'activité de la CK2 a donc été mesurée

dans les cellules prétraitées avec le SP600125 (collaboration avec le Dr Claude Cochet, méthode décrite dans l'article de Bourayne *et al.*, soumis dans JI).

Les cellules ont été prétraitées pendant 1h par le SP600125 ou le CX-4945 puis stimulées pendant 4h avec le DNCB et le CinA. L'activité de la CK2 dans les lysats protéiques totaux a été mesurée par le Dr Claude Cochet au CEA de Grenoble afin d'en doser l'activité. L'activité de la CK2 est évaluée par l'incorporation d'ATP radiomarqué sur un peptide substrat de la CK2 (Figure 56). On constate que l'activité de la CK2 est inhibée de la même manière dans les échantillons traités par le SP et le CX dans les cellules contrôles et traitées par le CinA. L'activité de la CK2 est inhibée de façon intermédiaire dans les échantillons traités par le SP et stimulés par le DNCB.

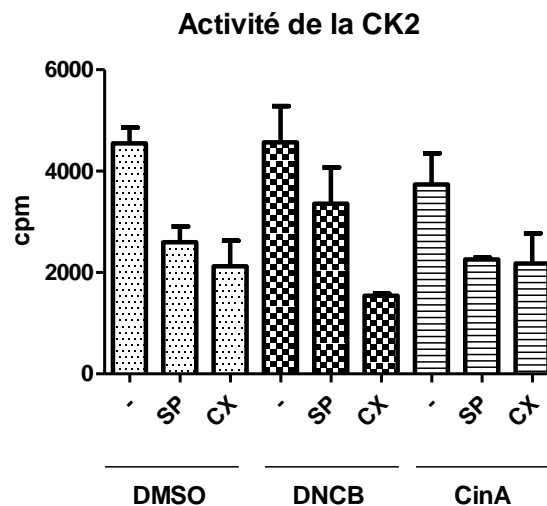


Figure 56. Le SP600125, inhibiteur de JNK inhibe l'activité de la CK2

Des cellules THP1 ont été prétraitées pendant 1h avec le SP600125 (SP, 20 μ M) ou le CX-4945 (CX, 10 μ M) puis stimulées pendant 4h par du DNCB 10 μ M ou du CinA 100 μ M. Les lysats protéiques totaux ont été incubés avec un peptide synthétique substrat de la CK2 et l'activité de la CK2 a été évaluée par mesure de l'incorporation d'ATP radiomarqué.

Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

Cette expérience montre donc que le SP600125 à la concentration de 20 μ M inhibe l'activité de la CK2 et pose la question de la spécificité de l'effet du SP observé.

3.9. L'extinction spécifique de JNK par siRNA n'altère pas la voie Nrf2

Afin de savoir si la voie JNK est réellement impliquée dans l'activation de Nrf2, nous avons alors inhibé de façon spécifique JNK1 et JNK2 en utilisant une approche par des ARN interférents. L'inhibition des 2 isoformes de JNK n'a pas d'effet sur l'accumulation de Nrf2 en réponse au CinA (Figure 57). On remarque cependant que l'effet de la transfection altère l'expression protéique de Nrf2, caractérisée par une diminution de l'accumulation de Nrf2 dans les cellules transfectées par le siRNA Random (siRNA Rd).

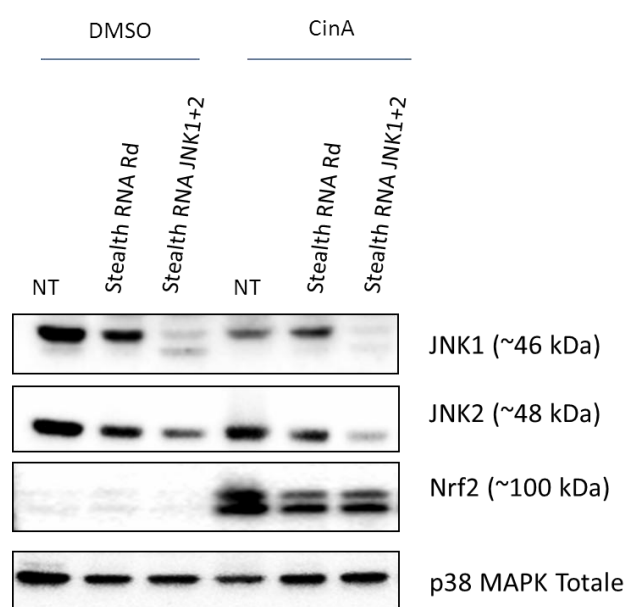


Figure 57. L'extinction de JNK par siRNA n'altère pas l'accumulation de Nrf2

Des cellules THP1 ont été transfectées par électroporation pendant 48h par des siRNA JNK1 et JNK2 (5 + 5 pmol finaux), puis stimulées pendant 4h par du CinA 100 μ M.

L'extinction de JNK1 et JNK2 et l'expression de Nrf2 ont été mesurées par western blot (WB) et analysée par le Chemidoc XRS (Biorad), p38 MAPK totale a été utilisée comme contrôle de charge.

Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Afin de savoir si JNK module l'activité transcriptionnelle de Nrf2, nous avons inhibé JNK par ARN interférents puis stimulé les THP1 pendant 6h par du DNCB et du CinA. L'expression de *ho-1* et *nqo-1* a été étudiée par RT-qPCR (Figure 58). L'expression de l'ARNm de *nrf2* et ses gènes cibles *ho-1* et *nqo-1* est augmentée en réponse au DNCB et au CinA, et n'est pas modifiée dans les cellules transfectées par siRNA JNK. Ces résultats suggèrent que la voie

JNK n'est pas impliquée dans l'activation de la voie Nrf2. L'effet obtenu avec l'inhibiteur SP600125 semble donc être dû à son effet non spécifique.

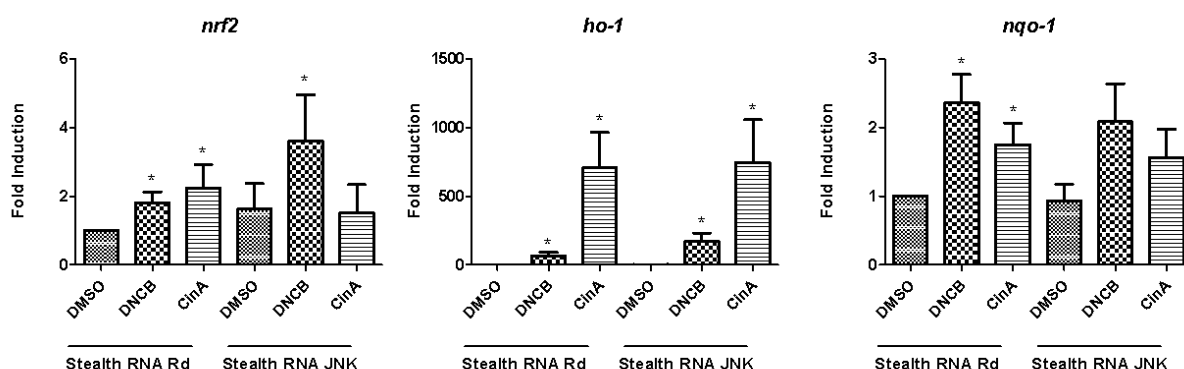


Figure 58. L'extinction de JNK par siRNA n'altère pas les gènes cibles de Nrf2

Des cellules THP1 ont été transfectées par électroporation pendant 48h par des siRNA JNK1 et JNK2 (5 + 5 pmol), puis stimulées pendant 4h par du DNCB 10 μ M et du CinA 100 μ M.

L'expression des ARNm de *nrf2*, *ho-1* et *ngo-1* a été mesurée par RT-qPCR. L'expression des ARNm a été mesurée avec le logiciel Biorad SFX Manager et les data a été analysée par la méthode du delta-delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct). Les résultats sont exprimés en facteurs d'induction comparés au contrôle DMSO (i.e. $ratio$ of $(1+E)^{-\Delta\Delta$ Ct des cellules traitées / $(1+E)^{-\Delta\Delta$ Ct des cellules contrôles).

Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

*p < 0,05 comparé au DMSO (Test de Mann-Whitney)

Nous avons étudié l'effet de la transfection des siRNA JNK sur l'activité de la CK2. Pour cela, nous avons transfecté des cellules THP1 avec les siRNA JNK puis stimulé pendant 4h avec du CinA 100 μ M. L'activité de la CK2 a été dosée par le Dr Claude Cochet dans les lysats protéiques totaux (Figure 59).

Etonnamment, le traitement des cellules transfectées par siRNA Rd et siRNA JNK puis simulées par le CinA tend à diminuer l'activité de la CK2. La transfection suivie d'une stimulation semble donc avoir un impact sur l'activité de la CK2 car cet effet n'est pas retrouvé dans les cellules non transfectées DMSO *versus* CinA (Cf Figure 56). Cependant l'activité de la CK2 ne semble pas différente entre les cellules siRNA Rd et les cellules siRNA JNK.

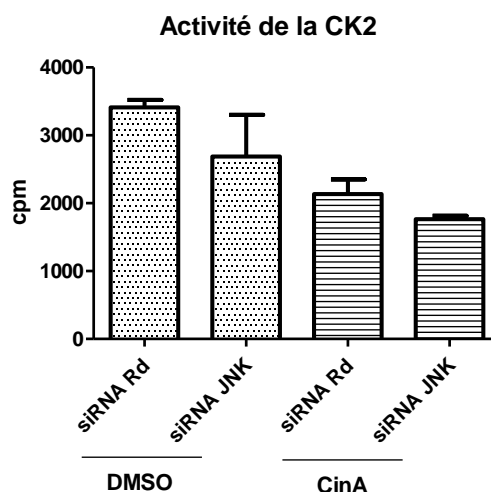


Figure 59. L’extinction de JNK par siRNA ne diminue pas l’activité de la CK2 comparé au siRNA contrôle

Des cellules THP1 ont été transfectées par électroporation pendant 48h par des siRNA JNK1 et JNK2, puis stimulées pendant 4h par du CinA 100 μ M.

Les lysats protéiques totaux ont été incubés avec un peptide synthétique substrat de la CK2 et l’activité de la CK2 a été évaluée par mesure de l’incorporation d’ATP radiomarqué.

Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

Le traitement des cellules THP1 par le SP600125 inhibe donc l’activité de la CK2. Cependant la transfection de siRNA JNK ne modifie pas l’activité de la CK2 en comparaison au siRNA Rd, soulignant ainsi la non-spécificité du SP600125. L’inhibition de l’accumulation de Nrf2 que nous observons avec le SP600125 n’est donc pas spécifique de JNK, et les résultats obtenus avec le siRNA JNK montrent que la kinase JNK n’est pas impliquée dans l’activation de la voie Nrf2. Il est possible que les effets observés avec le SP600125 soient une conséquence indirecte de l’inhibition de l’activité de la CK2 par le SP600125. Cependant, le CX-4945 tend à diminuer l’accumulation de Nrf2 en réponse au DNCB et au CinA, sans toutefois l’inhiber totalement. Ceci suggère que l’effet observé avec le SP600125 est la conséquence de l’inhibition non spécifique d’une kinase encore inconnue à ce jour.

Bien que le mécanisme d’action ne soit pas connu à ce jour, il est certain que la CK2 intervient dans l’activation de la voie Nrf2, contrairement à la kinase JNK. Cependant, l’étude de JNK nous a conduits à étudier c-Jun, son substrat principal. Nous avons identifié que c-Jun se fixe aux séquences ARE en réponse au CinA et interagit avec Nrf2 en réponse au DNCB, suggérant que c-Jun pourrait être un partenaire transcriptionnel de Nrf2.

DISCUSSION

Discussion

Les DC sont des cellules de l'immunité innée jouant un rôle majeur dans l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative : elles ont la capacité de reconnaître et d'endocyter un Ag, migrer jusqu'aux ganglions drainants afin de le présenter aux LT et générer une réponse immunitaire spécifique de cet Ag (Banchereau and Steinman, 1998). Les DC ne peuvent être activées par un Ag qu'en présence de signaux de danger. Ceux-ci sont de natures diverses : ils peuvent être de nature microbienne, comme le LPS bactérien, mais également endogènes comme les dérivés de la MEC, des molécules intracellulaires telles qu'HMGB1 ou les ERO, de l'ATP, la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β ... (Schaefer, 2014). La plupart des signaux de danger sont des agonistes des PRR et tout particulièrement des TLR et/ou des NLR.

L'activation des TLR et des NLR à la surface des DC entraîne l'activation de la voie NF- κ B et de la voie des MAPK ainsi que des facteurs de transcription AP-1 et IRF-3 (G. Chen *et al.*, 2009; Kawai and Akira, 2007). Ces voies vont permettre aux DC d'acquérir un phénotype membranaire mature et de sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et l'IL-12 (Nace *et al.*, 2012). Parmi ces voies, la p38 MAPK joue un rôle primordial dans l'activation de la DC : d'une part, l'inhibition pharmacologique de p38 MAPK altère l'expression de CD80, CD83 et CD86 en réponse au LPS, et d'autre part, p38 MAPK contrôle l'expression de l'IL-12, cytokine majeure dans la génération d'une réponse Th1 (Lu *et al.*, 1999). En effet, les DC et les macrophages issus de souris invalidées pour le gène *mkk3*, kinase activatrice de p38 MAPK, produisent très peu d'IL-12 en réponse au LPS, contrairement aux souris sauvages (Lu *et al.*, 1999). D'autres kinases sont connues pour réguler l'activation des DC, notamment la PKC, indispensable à la migration des cellules de Langerhans (Staquet *et al.*, 2004).

Afin de contrôler l'activation excessive des DC, d'autres kinases, telles que PI3K, régulent négativement la réponse engendrée par les ligands des TLR. PI3K inhibe la voie p38 MAPK, limitant la sécrétion d'IL-12 générée par l'activation des TLR et limitant ainsi une réponse Th1 excessive. En effet, des souris invalidées pour le gène de la *pi3k* produisent de fortes quantités d'IL-12 et sont incapables de générer une réponse Th2 (Fukao and Koyasu, 2003).

L'ensemble de ces voies de signalisation sont donc primordiales dans chacune des fonctions de la DC en régulant finement l'endocytose, la migration, l'acquisition d'un phénotype mature et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12, leur permettant ainsi de remplir leur rôle d'initiatrice de la réponse immunitaire adaptative.

Selon l'hypothèse actuelle en immuno-toxicologie, les molécules allergisantes peuvent mimer les signaux de danger. En effet, tout comme les signaux de danger « classiques », les haptènes activent la voie des MAPK et la voie NF- κ B, qui contrôlent l'activation des DC en réponse à ces haptènes (Neves *et al.*, 2011). De plus, les molécules allergisantes peuvent générer un stress oxydant, participant également au processus de maturation des DC *via* l'activation de ces voies (Trompezinski *et al.*, 2008). Par ailleurs, certains haptènes sont des agonistes des TLR, tels que le NiSO₄, pouvant directement lier le TLR4 humain et activer la signalisation subséquente (Schmidt *et al.*, 2010).

C'est en 2001 qu'Arrighi et collaborateurs ont mis en évidence pour la première fois dans les MoDC que l'induction de CD80, CD86 et CD83 en réponse au DNFB et au Ni dépend de p38 MAPK (Arrighi *et al.*, 2001). Par la suite, il a été confirmé que les molécules allergisantes activent les MAPK dans les DC. Le DNCB entraîne la phosphorylation de p38 et de JNK, tandis que le nickel entraîne la phosphorylation de p38, JNK et ERK (Ade *et al.*, 2007; Aiba *et al.*, 2003; Antonios *et al.*, 2009; Boisleve *et al.*, 2005). Dans les DC différenciées à partir des progéniteurs CD34⁺ issus de sang de cordon (CD43-DC), l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques a permis de mettre en évidence que l'expression de CD86 et CD83 est contrôlée par p38 MAPK en réponse au NiSO₄ et au DNCB (Antonios *et al.*, 2009; Boisleve *et al.*, 2005, 2004). De plus, les kinases p38 et JNK contrôlent l'expression de CCR7 à la surface des CD34-DC en réponse au NiSO₄ et au DNCB, permettant ainsi la migration des DC, évaluée *in vitro* par chimiotaxie dans une chambre de transwell en présence de CCL19, ligand de CCR7 (Boisleve *et al.*, 2004).

Par ailleurs, p38 MAPK contrôle la production d'IL-8 en réponse au DNCB, tandis qu'en réponse au NiSO₄, la production d'IL-1 β et de TNF α est contrôlée par ERK, et celle d'IL-12 est contrôlée par p38 MAPK (Aiba *et al.*, 2003; Antonios *et al.*, 2010).

Cependant, à ce jour, les kinases en amont de ces voies ne sont pas connues. C'est pourquoi, afin d'identifier de nouvelles voies de signalisation originales activées par les

molécules allergisantes dans les DC, un peptide array a été réalisé par le Dr Philippe Rousseau au sein de notre équipe. Ce peptide array contient plus de 950 motifs de phosphorylation différents présents au sein de protéines impliquées dans divers processus biologiques et phosphorylés par des kinases connues. Cette étude a mis en évidence que les molécules allergisantes activent des kinases déjà décrites dans la biologie de la DC telles qu'ERK et PKC, mais également une kinase dont le rôle dans la DC était encore inconnu : la protéine kinase CK2.

Au cours de ce travail, nous montrons que la CK2 contrôle l'expression de CD86, de PDL-1 et de CD54 en réponse au NiSO_4 , et l'expression de PDL-1, de CD54 et de CD40 en réponse au DNCB. Ces marqueurs ont déjà été décrits comme régulés positivement en réponse au NiSO_4 et au DNCB (Aiba *et al.*, 1997; Arrighi *et al.*, 2001; Turbica *et al.*, 2015). Par ailleurs, les MoDC stimulées par le NiSO_4 produisent les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-12p70 et IL-23 et les chimiokines CXCL-8 et CCL-4, comme déjà décrit par d'autres (Aiba *et al.*, 1997; Antonios *et al.*, 2010; De Smedt *et al.*, 2005, 2001). Les MoDC stimulées avec le DNCB produisent les chimiokines CXCL-8 et CCL-4, mais de plus faibles quantités d'IL-6 et de TNF α (Aiba *et al.*, 1997; Boislevé *et al.*, 2004; De Smedt *et al.*, 2005), et des quantités négligeables d'IL-1 β , d'IL-12p70 et d'IL-23. La CK2 contrôle positivement la production d'IL-6, de TNF α , d'IL-12p70 et de CCL4 en réponse au NiSO_4 , tandis qu'elle contrôle négativement la production d'IL-1 β et d'IL-23, cytokines clés dans l'orientation d'une réponse Th17 (van Beelen *et al.*, 2007). La CK2 contrôle positivement la production de CCL-4 et négativement la production de TNF α en réponse au DNCB.

Ainsi, nous montrons pour la première fois que la CK2 joue un rôle dans les DC en contrôlant l'acquisition d'un phénotype mature et la production de cytokines pro-inflammatoires clés dans l'orientation d'une réponse lymphocytaire T en réponse aux molécules allergisantes.

Comme il l'a déjà été décrit, nous avons confirmé que la stimulation des MoDC par du NiSO_4 génère une réponse Th1 et Th17 (Dyring-Andersen *et al.*, 2013) et la stimulation des MoDC par du DNCB génère une réponse Th1 (Pickard *et al.*, 2007). L'inhibition de la CK2 dans les MoDC stimulées par le DNCB inhibe la prolifération des LT, contrairement aux MoDC prétraitées avec le CX-4945 et stimulées avec le NiSO_4 . De plus l'inhibition de la CK2 dans les

MoDC stimulées par le NiSO_4 et le DNCB entraîne une forte diminution de la sécrétion d' $\text{IFN}\gamma$ par les LT et par conséquent une inhibition de la polarisation Th1. L'inhibition de l'activité de la CK2 dans les MoDCs stimulées par le NiSO_4 ne modifie pas la réponse Th17. De plus, la forte production d'IL-23 et d'IL-1 β et la diminution d'IL-12p70 par les MoDCs stimulées par du NiSO_4 en l'absence d'activité de la CK2 pourrait déséquilibrer la polarisation Th1/Th17 initiale en faveur de la réponse Th17 observée.

Il a précédemment été décrit qu'une modification du phénotype module la réponse lymphocytaire T. Ainsi, l'inhibition de PDL-1 à la surface des LC stimulées par du peptidoglycane entraîne une forte production d'IL-17 par les LT mémoires allogéniques (Hitzler *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'inhibition de CD86 à la surface de LC stimulées par du peptidoglycane conduit à une diminution de la libération d' $\text{IFN}\gamma$ (Hitzler *et al.*, 2012). Ceci suggère que les diminutions de PDL-1 et de CD86 observées à la surface des MoDC stimulées par du NiSO_4 en l'absence d'activité de la CK2 peuvent participer à la diminution de la sécrétion d' $\text{IFN}\gamma$ et au maintien de la production d'IL-17 par les LT mis en culture avec ces DC. L'activité de la CK2 au sein de la DC joue donc un rôle dans l'activation des LT en réponse au DNCB, et est cruciale dans la génération d'une polarisation Th1 en réponse aux molécules allergisantes, sans modifier une réponse Th17 existante.

En l'absence de l'activité de la CK2, les DC stimulées par du DNCB acquièrent un phénotype qui n'est pas complètement mature $\text{PDL-1}^{\text{low}}\text{CD54}^{\text{low}}\text{CD40}^{\text{low}}$ et $\text{IL-6}^{\text{low}}\text{CXCL-8}^{\text{low}}\text{CCL-4}^{\text{low}}$ mais deviennent de fortes productrices de $\text{TNF}\alpha$. L'administration répétée de faibles doses d'allergisant peut générer une fenêtre de tolérance (Low Zone Tolérance, cf III.4.2.2). Au cours de la LZT, des DC tolérogènes $\text{CD11}^+\text{CD8}^+$ sécrètent du $\text{TNF}\alpha$ permettant l'activation de LT CD8^+ suppresseurs (Luckey *et al.*, 2011). Le $\text{TNF}\alpha$ produit par les MoDC stimulés par le DNCB en l'absence de la CK2 pourrait donc générer une réponse « tolérogène-like » en inhibant la prolifération des LT et leur production de cytokines. Cependant, les LT cultivés avec les MoDC stimulées par le DNCB en l'absence de l'activité de la CK2 ne produisent pas d'IL-10, connue pour jouer un rôle dans l'induction de la tolérance (résultats non montrés). Dans le futur, nous chercherons à mettre en évidence l'expression de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) ou d'ICOS-L dans les DC, connus pour induire une tolérance immunitaire

(Munn and Mellor, 2007; Vocanson *et al.*, 2010). Par ailleurs, ces DC n'induisent pas la prolifération des LT, mais les LT conservent une prolifération « basale » d'environ 25% de cellules CFSE^{low}. Il est donc possible que ces LT soient dans un état anergique. Nous pourrions investiguer cette hypothèse en mesurant la sécrétion d'IL-2 de ces LT, diminuée lors de l'anergie, l'expression des récepteurs co-inhibiteurs CTLA-4 ou PD-1 à la surface des LT et l'expression du facteur de transcription NFAT1, tous ces facteurs participant au maintien de l'état anergique (Valdor and Macian, 2013).

Dans ce travail nous avons donc montré pour la première fois que la CK2 joue un rôle dans l'activation d'une réponse immunitaire en réponse aux molécules allergisantes. La CK2 contrôle d'une part l'acquisition d'un phénotype mature des DC, et d'autre part l'activation des LT et l'orientation Th1 *via* la production de cytokines pro-inflammatoires clés par la DC, tout en maintenant une réponse Th17 préexistante (de Bourayne *et al.*, soumis dans JI). CK2 joue donc un rôle clé dans le contrôle de l'activation des DC en réponse aux molécules allergisantes et dans la génération d'une réponse lymphocytaire T.

Nous avons également observé que l'absence d'activité de la CK2 dans les MoDC non stimulées mises en culture avec des LT CD4⁺ induit la production d'IL-5 et d'IL-13, signature d'une réponse Th2, sans prolifération lymphocytaire. Ces résultats sont en accord et complémentaires avec la récente étude d'Ulges et collaborateurs qui ont montré que la délétion de CK2 spécifiquement dans les Treg entraîne la prolifération d'une sous-population de Treg ILT3⁺ (Ulges *et al.*, 2015). Ces Treg ILT3⁺ sont incapables de contrôler la maturation de DC IRF4⁺PDL-2⁺ responsables du développement d'une réponse Th2 *in vivo* (Ulges *et al.*, 2015). Afin d'expliquer cette réponse Th2 spontanée dans notre modèle, nous avons étudié si l'inhibition de l'activité de la CK2 dans les DC conduit à l'acquisition d'un phénotype DC2, DC jouant un rôle dans la polarisation d'une réponse Th2, en l'absence de *stimulus*. Les DC prétraitées avec le CX-4945 n'expriment ni PDL-2 ni OX40-L (résultats non montrés), deux marqueurs connus pour orienter une polarisation Th2 (Ofiazoglu *et al.*, 2004; Salek-Ardakani *et al.*, 2003). A ce jour, nous n'avons pas identifié de marqueur phénotypique de la DC expliquant la polarisation Th2 spontanée.

L'étude des facteurs de transcription de la famille des IRF nous a permis d'explicitier la capacité de la CK2 à participer à la polarisation des LT. Les IRF sont en effet connus pour

réguler la transcription de cytokines impliquées dans la polarisation. Nous avons mis en évidence une belle association entre les IRF exprimés par les DC en réponse aux molécules allergisantes et la polarisation des LT. Ainsi, la stimulation des MoDC par le NiSO₄ induit un phénotype IRF1⁺⁺IRF8⁺⁺IRF4⁺⁺PD-L1^{high}CD54^{high}, justifiant une réponse Th1 et Th17 (Gao *et al.*, 2013; Rengarajan, 2002; Yoshida *et al.*, 2014). Bien que nous n'observons pas de production des cytokines IL-5 et IL-13 en réponse à des DC stimulées par du NiSO₄, il a déjà été décrit que le NiSO₄ pouvait induire une réponse Th2 dans des LT naïfs (Turbica *et al.*, 2015). La stimulation des MoDC par du DNCB induit un phénotype IRF1⁺PD-L1^{low}CD54^{low} pouvant justifier une orientation Th1.

L'inhibition de l'activité de la CK2 diminue l'expression de l'ARNm codant pour *irf1* en réponse aux deux molécules allergisantes et *irf-8* en réponse au NiSO₄, pouvant expliquer ainsi la diminution de la polarisation Th1. De façon très intéressante, nous montrons que la CK2 contrôle négativement l'expression d'*irf4* à l'état basal, ce qui explique très certainement la polarisation Th2 spontanée en absence de molécule allergisante.

Forts de ces observations *in vitro*, nous avons étudié les conséquences de l'inhibition de l'activité de la CK2 dans les DC dans un modèle d'HSC *in vivo*. Pour ce faire, nous avons adressé cette question *via* un transfert adoptif de DC issues de moelle osseuse de souris (BMDC) préalablement traitées ou non par le CX-4945 et stimulées par la molécule allergisante DNBS. Au sein de notre équipe, Zeina El Ali a montré que l'injection intradermale au niveau de l'abdomen de souris de BMDC stimulées *in vitro* par une molécule allergisante telle que le DNBS suivie cinq jours plus tard de l'élicitation par application du DNCB sur les oreilles induit une réaction inflammatoire d'origine allergique (résultats non publiés). Cette réaction inflammatoire est caractérisée par le gonflement des oreilles des souris, mesuré à l'aide d'un micromètre.

L'injection de BMDC prétraitées avec le CX-4945 et non stimulées par le DNBS entraîne un gonflement de l'oreille similaire à celui induit par l'injection de BMDC stimulées par le DNBS, voire même plus élevé 72h après l'élicitation. Cette inflammation n'est pas d'origine allergique étant donné l'absence de sensibilisation par le DNBS.

Ulges et collaborateurs ont récemment mis en évidence que les souris invalidées pour le gène de la sous-unité β de la CK2 spécifiquement dans les Treg développent une pathologie

respiratoire similaire à l'asthme. Une forte quantité d'IL-13 est présente dans les surnageants des cellules pulmonaires et des LT ganglionnaires en absence de sensibilisation par l'ovalbumine (Ulges *et al.*, 2015). Une réponse Th2 se développe spontanément *in vivo* en l'absence de la CK2 dans les Treg, *via* l'émergence d'une sous-population de Treg ILT3⁺ incapables de contrôler la maturation de DC IRF4⁺PDL-2⁺, responsables du développement d'une réponse Th2 *in vivo* (Ulges *et al.*, 2015). Dans notre modèle, ces résultats suggèrent que l'inhibition de la CK2 dans les DC pourrait induire une réponse Th2 spontanée en absence de sensibilisation par le DNBS. Ceci pourra être confirmé par l'étude des cytokines dans les surnageants des LT ganglionnaires préalablement récupérés et mis en culture, selon le protocole d'Ulges et collaborateurs.

Des résultats préliminaires montrent que l'inhibition de l'activité de la CK2 dans les BMDC augmente l'expression de l'ARNm des cytokines *il-1β*, *tnfα* et *il-6*, suggérant l'état pro-inflammatoire de ces DC. D'autres expériences préliminaires réalisées avec des BMDC stimulées par du DNCB n'ont pas montré de différences de l'expression du CD86, du CD54 et du CD40 en absence de l'activité de la CK2 (*data non montrées*). Cependant, ces résultats sont à confirmer car les BMDC étaient dans un état activé à l'état basal lors des expériences, avec l'expression de CD86 supérieure à 35% dans les contrôles. Il nous faudra caractériser plus finement le profil des BMDC en l'absence de l'activité de la CK2.

Par ailleurs, nous devons également caractériser le devenir de ces BMDC injectées aux souris. Une seule expérience préliminaire suggère qu'une faible quantité de BMDC semblerait être présente dans les oreilles des souris qui ont reçu l'injection de BMDC traitées par le CX, comme le témoigne la présence de cellules CMH II⁺/PKH67⁺. Ceci suggérerait que l'activité de la CK2 pourrait contrôler la migration des DC. De plus, un résultat préliminaire a mis en évidence que CK2 contrôle négativement l'expression de l'ARNm de *cxc4*, récepteur de CXCL12 impliqué dans la migration des DC (résultats non montrés).

Dans notre modèle, plusieurs questions relatives à la réponse inflammatoire non allergique restent ouvertes : l'inflammation est-elle généralisée ou localisée au niveau cutané après élicitation malgré l'absence de sensibilisation chez les souris ? S'agit-il d'une réponse immunitaire innée ou met-elle en jeu une réponse immunitaire adaptative ? Les résultats d'Ulges et collaborateurs ainsi que ceux résumés dans l'article (de Bourayne *et al.*,

soumis dans JI) laissent penser que l'absence de l'activité de la CK2 dans les DC va entraîner la génération d'une réponse Th2 spontanée. De plus, les BMDC prétraitées avec le CX-4945 expriment plus fortement l'*il-1 β* , signal de danger nécessaire à l'induction de la réponse inflammatoire.

Par la suite, des biopsies cutanées nous permettront de caractériser l'infiltrat inflammatoire et d'identifier la présence de cellules de l'immunité impliquées dans l'inflammation de la peau, telles que les PN, les macrophages, les mastocytes ou les T_{EFF}.

Cette expérience montre également que les souris développent une réaction inflammatoire exacerbée lorsque les BMDC injectées sont stimulées par le DNBS en absence d'activité de la CK2. Il semble qu'il y ait un effet additionnel de l'inflammation générée d'une part par l'inhibition de la CK2 et d'autre part par la molécule allergisante. Le DNCB induit préférentiellement une réponse Th1/Tc1 (Pickard *et al.*, 2007), et nous avons décrit *in vitro* dans les MoDC que l'inhibition de la CK2 résulte en une inhibition de la réponse Th1. L'importance de l'augmentation de l'épaisseur de l'oreille après injection de BMDC prétraitées par le CX-4945 et stimulées par le DNBS laisse penser que la réponse lymphocytaire T n'a pas été inhibée. Cependant, il est possible que la polarisation soit modifiée et ceci pourra être caractérisé par un dosage des cytokines dans les surnageants des cellules ganglionnaires.

Les molécules allergisantes activent en parallèle le facteur de transcription Nrf2 (Ade *et al.*, 2009; Migdal *et al.*, 2013) et CK2 (de Bourayne *et al.*, soumis dans JI), chacun jouant un rôle dans la génération d'une réponse immunitaire (El Ali *et al.*, 2013). Plusieurs études décrivent que l'activation de Nrf2 nécessite un état phosphorylé, et différentes kinases, telles que les MAPK, PKC, PERK et PI3K sont impliquées dans cet état de phosphorylation (Keum and Choi, 2014). Par ailleurs, CK2 phosphoryle le domaine de transactivation Neh4 et Neh5 de Nrf2 dans les cellules de neuroblastome humain IMR 32 en réponse au tBHQ, molécule activatrice de Nrf2 (Apopa *et al.*, 2008).

Nous avons montré qu'en réponse au DNCB et au CinA, Nrf2 s'accumule sous forme de deux bandes observées par Western blot. Par une approche avec une lambda-phosphatase recombinante, nous avons mis en évidence et confirmé que la forme de plus haut poids moléculaire de Nrf2 est sous une forme phosphorylée (Apopa *et al.* 2008). L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques nous a permis d'identifier que les kinases CK2 et JNK

interviennent dans l'activation de Nrf2 en réponse au DNCB et au CinA. Nous avons par ailleurs confirmé que PI3K participe à l'activation de Nrf2 et que GSK3 β exerce un contrôle négatif sur Nrf2 dans notre modèle.

L'inhibition de l'activité de la CK2 ne diminue pas significativement l'accumulation de Nrf2 en réponse aux molécules allergisantes, et ne modifie pas le profil de phosphorylation en réponse au DNCB étudié par un gel 2D. Ces résultats suggèrent que Nrf2 n'est pas un substrat direct de la CK2 dans notre modèle. Cependant, l'inhibition de l'activité de la CK2 conduit à une très forte diminution de l'expression de l'ARNm codant pour *nqo-1* et *ho-1*, gènes cibles de Nrf2, en réponse au DNCB et au CinA sans toutefois modifier l'expression de l'ARNm de *nrf2*. Il semble donc que la CK2 soit indispensable à l'activité transcriptionnelle de Nrf2.

L'invalidation de JNK par siRNA ne modifie pas l'accumulation de Nrf2, ni l'expression de l'ARNm de ses gènes cibles *ho-1* et *nqo-1* en réponse aux deux molécules allergisantes. La kinase JNK ne semble donc pas être impliquée dans l'activation de la voie Nrf2 en réponse au DNCB et au CinA. Il a précédemment été décrit que le SP600125, comme beaucoup d'autres inhibiteurs pharmacologiques, n'est pas spécifique et inhibe de nombreuses autres kinases (Bain *et al.*, 2007). Nous montrons que le SP600125, contrairement au siRNA JNK, inhibe l'activité de la CK2, suggérant qu'une partie de l'effet observé avec le SP600125 est une conséquence de l'inhibition de la CK2. Cependant, le CX-4945 n'inhibe pas significativement l'accumulation de Nrf2 contrairement au SP600125, ce qui laisse penser qu'une autre kinase inhibée de façon non spécifique est impliquée dans l'activation de la voie Nrf2.

L'identification de la kinase JNK comme potentiellement impliquée dans l'activation de la voie Nrf2 nous a conduits à étudier c-Jun, substrat principal de JNK. Dans des cellules d'hépatome humain HepG2, il a été décrit que c-Jun peut s'hétérodimériser avec Nrf2 en réponse au 4-Hydroxynonénal pour permettre la transcription de ses gènes cibles (Levy *et al.*, 2009). Par une approche de co-immunoprécipitation, nous montrons que Nrf2 forme un complexe avec c-Jun en réponse au DNCB mais pas au CinA. Ces résultats montrent que les molécules allergisantes vont activer des voies de signalisation différentes, conduisant à l'activation d'un partenaire d'hétérodimérisation variable selon la molécule allergisante.

La CK2 étant indispensable à l'activité transcriptionnelle de Nrf2, plusieurs hypothèses sont possibles et pourront être explorées dans le futur :

- (1) la CK2 phosphorylerait le partenaire transcriptionnel de Nrf2. Son absence rendrait le complexe transcriptionnel non fonctionnel, bien que Nrf2 soit opérationnel. Pour le moment, l'hypothèse est difficile à explorer car il faut identifier le partenaire transcriptionnel de Nrf2, qui semble dépendre du *stimulus* et du modèle cellulaire.
- (2) La CK2 assure une phosphorylation directe ou indirecte sur Nrf2 ou son partenaire, nécessaire pour la fixation des séquences ARE. Cette hypothèse pourra être explorée par une approche avec des sondes ARE biotinylées et est en cours. L'inhibition de l'activité de la CK2 ne semble pas modifier le schéma de phosphorylation induit par le DNCB, il semble donc peu probable que Nrf2 soit un substrat direct de la CK2.
- (3) La CK2 phosphoryle Keap1, lui permettant ainsi d'adopter une structure conformationnelle compatible avec la fixation des séquences ARE. En effet, une récente étude a montré par une approche Förster Resonance Energy Transfer (FRET) qu'en réponse au sulforaphane, Nrf2 est stabilisé en adoptant une structure appelée 'fermée' c'est-à-dire en étant fixé à un dimère de Keap1 *via* ses domaines DLG et ETGE (Baird *et al.*, 2014). En présence ou non de l'activité de la CK2, nous pourrions étudier le complexe Nrf2/Keap1 en réponse au DNCB et au CinA par co-immunoprécipitation, ainsi que le profil de phosphorylation de Keap1 par un gel 2D.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Conclusions & Perspectives

Nous montrons pour la première fois *in vitro* le rôle clé de la protéine kinase CK2 au sein des DC en réponse aux molécules allergisantes dans la génération d'une réponse immunitaire. De plus, à l'état basal, l'activité de la CK2 dans les DC est nécessaire pour inhiber l'émergence d'une réponse Th2 spontanée ; ces résultats sont complémentaires de ceux d'Ulges et collaborateurs, premiers à mettre en évidence le contrôle de la réponse Th2 à l'état basal par la CK2 *via* les Treg (Ulges *et al.*, 2015).

L'activité de la CK2 permet à la DC d'acquérir un phénotype mature et de produire des cytokines pro-inflammatoires nécessaires à l'initiation d'une réponse immunitaire. Cependant, la CK2 a un effet différent dans l'activation des DC selon la molécule allergisante, suggérant qu'elle interagit différemment avec les autres voies de signalisation activées, telles que les MAPK et la voie NF- κ B, propres à chaque molécule allergisante. L'inhibition de la CK2 pourrait moduler l'activation de ces voies.

En l'absence de la CK2, les DC stimulées par le DNCB sont « semi-matures » et n'activent pas la prolifération des LT. De plus, elles deviennent de fortes productrices de TNF α , qui pourrait participer à l'induction d'une réponse tolérogène. En revanche, les DC stimulées par le NiSO₄ en l'absence de la CK2 acquièrent un phénotype suffisant pour activer la prolifération des LT, et produisent de grande quantité d'IL-1 β et d'IL-23, permettant de maintenir une réponse Th17. Mais l'activité de la CK2 dans la DC en réponse aux deux molécules allergisantes NiSO₄ et DNCB est indispensable à la sécrétion d'IFN γ par les LT, permettant d'induire une réponse Th1.

Ceci soulève une question : la CK2 est-elle activée par toutes les molécules induisant une réponse Th1 car elle est indispensable à la production d'IFN γ par les LT ou est-ce une signature des molécules allergisantes cutanées ? Une approche par un peptide array devrait permettre de comparer les profils de phosphorylation de substrats de la CK2 entre plusieurs groupes de molécules : les molécules allergisantes cutanées respiratoires principalement décrites pour induire une réponse Th2 (Dearman *et al.*, 1997), les molécules allergisantes

cutanées principalement décrites pour induire une Th1 (Dearman *et al.*, 1997), et un panel de molécules non allergisantes n'activant pas de réponse lymphocytaire T.

Nos résultats préliminaires de transferts adoptifs montrent que la CK2 jouerait un rôle important dans le contrôle de la réponse inflammatoire en présence et en l'absence d'une molécule allergisante *in vivo*. Pour explorer le rôle de la CK2 dans le contrôle de la réponse Th1 en réponse aux molécules sensibilisantes et de la réponse Th2 en l'absence d'activation par les molécules chimiques, une étude de polarisation T serait intéressante à réaliser afin de justifier l'induction de cette réponse inflammatoire en présence ou non de l'haptène. Cette étude devrait nous permettre de dire si la polarisation Th2/Th17 se ségrège en fonction du produit chimique.

Ce travail a également montré que la CK2 est indispensable à la transcription des gènes cibles de Nrf2, facteur de transcription majeur dans la lutte contre le stress électrophile généré par les haptènes, suggérant l'implication de la CK2 dans la détoxification des molécules allergisantes. L'absence de la CK2 conduirait à une moins bonne expression des protéines de détoxification et par conséquent une mauvaise métabolisation de la molécule chimique. La concentration de l'haptène en l'absence de CK2 serait alors plus importante comparée à celle en conditions normales et expliquerait que les souris présentent une augmentation de leur réponse inflammatoire.

L'absence de l'activité de la CK2 mime les effets de l'absence de Nrf2 au cours de la réponse inflammatoire cutanée d'origine allergique (El Ali *et al.*, 2013). Une question se pose : l'effet anti-inflammatoire de la CK2 est-il Nrf2-dépendant *via* la transcription de ses gènes cibles ? Notre modèle murin invalidé pour le gène *nrf2* devrait nous permettre de caractériser l'effet de la CK2 *in vitro*, sur les BMDC issues de souris *nrf2*^{-/-} et de souris sauvages afin de déterminer si les effets inflammatoires du CX-4945 sont majorés en l'absence de Nrf2. Nous savons que l'injection de BMDC issues de souris *nrf2*^{-/-} non stimulées par un haptène n'induit pas de réponse inflammatoire comme les BMDC en l'absence de la CK2 (résultats de Zeina El Ali *et al.*, non publiés). Ceci suggère que l'effet de la CK2 n'est pas seulement Nrf2-dépendant.

Nous avons également montré qu'en réponse aux molécules allergisantes, Nrf2 existe sous une forme phosphorylée. La kinase JNK n'est pas impliquée dans l'activation de Nrf2, mais c-Jun, son substrat principal (Minden *et al.*, 1994), pourrait être un éventuel partenaire transcriptionnel de Nrf2. En effet, c-Jun se lie aux séquences ARE sous une forme phosphorylée active en réponse au CinA et probablement au DNCB. Cependant, Nrf2 interagit avec c-Jun en réponse au DNCB mais pas au CinA, suggérant que la nature du complexe transcriptionnel varie selon la réactivité chimique de la molécule. L'invalidation par siRNA de c-jun devrait être un bon compromis pour nous permettre de déterminer son rôle dans le complexe transcriptionnel en réponse à différents haptènes.

Enfin, Nrf2 ne semble pas être un substrat direct de CK2, kinase pourtant indispensable à l'expression de l'ARNm de ses gènes cibles *ho-1* et *nqo-1*. Il n'est pas impossible que CK2 participe à la phosphorylation de c-Jun ou d'autres partenaires transcriptionnels de Nrf2.

In fine, ces travaux contribuent à une meilleure connaissance des voies de signalisation activées par les molécules allergisantes dans les cellules dendritiques, résumés dans la figure 60.

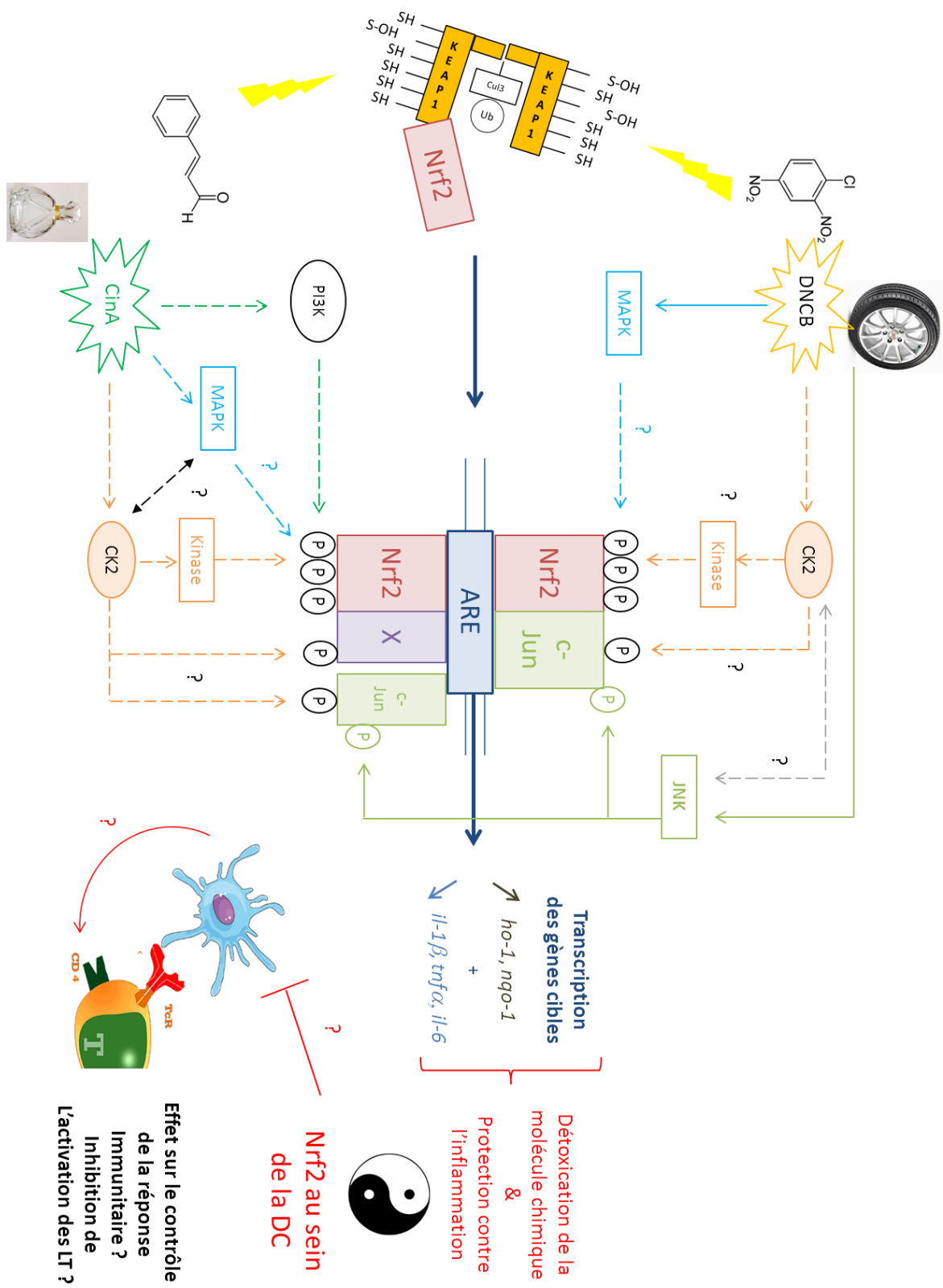


Figure 60. Bilan & Perspectives

BIBLIOGRAPHIE

A.

- Abadie, V., Badell, E., Douillard, P., Ensergueix, D., Leenen, P.J.M., Tanguy, M., Fiette, L., Saeland, S., Gicquel, B., Winter, N., 2005. Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after Mycobacterium bovis BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood* 106, 1843–1850.
- Adam, J., Pichler, W.J., Yerly, D., 2011. Delayed drug hypersensitivity: Models of T-cell stimulation. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 71, 701–707.
- Ade, N., Antonios, D., Kerdine-Romer, S., Boislevé, F., Rousset, F., Pallardy, M., 2007. NF- κ B plays a major role in the maturation of human dendritic cells induced by NiSO₄ but not by DNCB. *Toxicol Sci* 99, 488–501.
- Ade, N., Leon, F., Pallardy, M., Peiffer, J.L., Kerdine-Romer, S., Tissier, M.H., Bonnet, P.A., Fabre, I., Ourlin, J.C., 2009. HMOX1 and NQO1 genes are upregulated in response to contact sensitizers in dendritic cells and THP-1 cell line: role of the Keap1/Nrf2 pathway. *Toxicol Sci* 107, 451–460.
- Aeby, P., Ashikaga, T., Bessou-Touya, S., Schepky, A., Gerberick, F., Kern, P., Marrec-Fairley, M., Maxwell, G., Ovigne, J.M., Sakaguchi, H., Reisinger, K., Tailhardat, M., Martinozzi-Teissier, S., Winkler, P., 2010. Identifying and characterizing chemical skin sensitizers without animal testing: Colipa's research and method development program. *Toxicol. Vitro* 24, 1465–1473.
- Afonyushkin, T., Oskolkova, O. V., Binder, B.R., Bochkov, V.N., 2011. Involvement of CK2 in activation of electrophilic genes in endothelial cells by oxidized phospholipids. *J. Lipid Res.* 52, 98–103.
- Aiba, S., Manome, H., Nakagawa, S., Mollah, Z.U.A., Mizuashi, M., Ohtani, T., Yoshino, Y., Tagami, H., 2003. p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and 2,4-dinitrochlorobenzene. *J. Invest. Dermatol.* 120, 390–399.
- Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H., Tagami, H., 1997. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27, 3031–3038.
- Ainscough, J.S., Frank Gerberick, G., Dearman, R.J., Kimber, I., 2012. Danger, intracellular signaling, and the orchestration of dendritic cell function in skin sensitization. *J. Immunotoxicol.* 1–12.
- Akdis, M., Palomares, O., Van De Veen, W., Van Splunter, M., Akdis, C.A., 2012. T H17 and T H22 cells: A confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 1438–1449.
- Akiba, H., Kehren, J., Ducluzeau, M.T., Krasteva, M., Horand, F., Kaiserlian, D., Kaneko, F., Nicolas, J.F., 2002. Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8⁺ T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis. *J Immunol* 168, 3079–3087.
- Alam, J., Stewart, D., Touchard, C., Boinapally, S., Choi, A.M., Cook, J.L., 1999. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 274, 26071–26078.
- Alam, J., Wicks, C., Stewart, D., Gong, P., Touchard, C., Otterbein, S., Choi, A.M., Burow, M.E., Tou, J., 2000. Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. Role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor. *J Biol Chem* 275, 27694–27702.
- Albanesi, C., 2010. Keratinocytes in allergic skin diseases. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 10, 452–456.

- Albanesi, C., Cavani, A., Girolomoni, G., 1999. IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha. *J. Immunol.* 162, 494–502.
- Albanesi, C., Scarponi, C., Cavani, A., Federici, M., Nasorri, F., Girolomoni, G., 2000. Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon-gamma- and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 115, 81–87.
- Albanesi, C., Scarponi, C., Sebastiani, S., Cavani, A., Federici, M., Sozzani, S., Girolomoni, G., 2001. A cytokine-to-chemokine axis between T lymphocytes and keratinocytes can favor Th1 cell accumulation in chronic inflammatory skin diseases. *J. Leukoc. Biol.* 70, 617–623.
- Al-Huseini, L.M.A., Yeang, H.X.A., Hamdam, J.M., Sethu, S., Alhumeed, N., Wong, W., Sathish, J.G., 2014. Heme oxygenase-1 regulates Dendritic cell function through modulation of p38 MAPK-CREB/ATF1 signaling. *J. Biol. Chem.* 289, 16442–16451.
- Allen, C.D.C., Okada, T., Cyster, J.G., 2007. Germinal-Center Organization and Cellular Dynamics. *Immunity* 27, 190–202.
- Anderson, K. V., 2000. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 13–19.
- Antonios, D., Ade, N., Kerdine-Romer, S., Assaf-Vandecasteele, H., Larange, A., Azouri, H., Pallardy, M., 2009. Metallic haptens induce differential phenotype of human dendritic cells through activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways. *Toxicol Vitro.* 23, 227–234.
- Antonios, D., Rousseau, P., Larange, A., Kerdine-Romer, S., Pallardy, M., 2010. Mechanisms of IL-12 synthesis by human dendritic cells treated with the chemical sensitizer NiSO4. *J Immunol* 185, 89–98.
- Apopa, P.L., He, X., Ma, Q., 2008. Phosphorylation of Nrf2 in the transcription activation domain by casein kinase 2 (CK2) is critical for the nuclear translocation and transcription activation function of Nrf2 in IMR-32 neuroblastoma cells. *J Biochem Mol Toxicol* 22, 63–76.
- Aptula, A.O., Patlewicz, G., Roberts, D.W., Schultz, T.W., 2006. Non-enzymatic glutathione reactivity and in vitro toxicity: A non-animal approach to skin sensitization. *Toxicol. Vitro.* 20, 239–247.
- Aptula, A.O., Roberts, D.W., Pease, C.K., 2007. Haptens, prohaptens and prehaptens, or electrophiles and proelectrophiles. *Contact Dermatitis* 56, 54–56.
- Arens, R., Schoenberger, S.P., 2010. Plasticity in programming of effector and memory CD8+ T-cell formation. *Immunol. Rev.* 235, 190–205.
- Ariga, H., Takahashi-Niki, K., Kato, I., Maita, H., Niki, T., Iguchi-Ariga, S.M.M., 2013. Neuroprotective function of dj-1 in Parkinson's disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.*
- Arlt, A., Sebens, S., Krebs, S., Geismann, C., Grossmann, M., Kruse, M.-L., Schreiber, S., Schäfer, H., 2012. Inhibition of the Nrf2 transcription factor by the alkaloid trigonelline renders pancreatic cancer cells more susceptible to apoptosis through decreased proteasomal gene expression and proteasome activity. *Oncogene* 32, 4825–35.
- Arrighi, J.F., Rebsamen, M., Rousset, F., Kindler, V., Hauser, C., 2001. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol* 166, 3837–3845.
- Artaud-Macari, E., Goven, D., Brayer, S., Hamimi, A., Besnard, V., Marchal-Somme, J., Ali, Z. El, Crestani, B., Kerdine-Römer, S., Boutten, A., Bonay, M., 2012. Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Nuclear

Translocation Induces Myofibroblastic Dedifferentiation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 66–79.

Arthur, J.C., Lich, J.D., Ye, Z., Allen, I.C., Gris, D., Wilson, J.E., Schneider, M., Roney, K.E., O'Connor, B.P., Moore, C.B., Morrison, A., Sutterwala, F.S., Bertin, J., Koller, B.H., Liu, Z., Ting, J.P.-Y., 2010. Cutting edge: NLRP12 controls dendritic and myeloid cell migration to affect contact hypersensitivity. *J. Immunol.* 185, 4515–4519.

Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., Toyoda, H., 2006. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol Vitro.* 20, 767–773.

Askenase, P.W., Bursztajn, S., Gershon, M.D., Gershon, R.K., 1980. T cell-dependent mast cell degranulation and release of serotonin in murine delayed-type hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 152, 1358–1374.

Askenase, P.W., Majewska-Szczepanik, M., Kerfoot, S., Szczepanik, M., 2011. Participation of inkt cells in the early and late components of Tc1-mediated DNFB contact sensitivity: Cooperative role of ???-T cells. *Scand. J. Immunol.* 73, 465–477.

Askenase, P.W., Szczepanik, M., Itakura, A., Kiener, C., Campos, R.A., 2004. Extravascular T-cell recruitment requires initiation begun by V??14+ NKT cells and B-1 B cells. *Trends Immunol.* 25, 441–449.

Assier, E., Marin-Esteban, V., Haziot, A., Maggi, E., Charron, D., Mooney, N., 2007. TLR7/8 agonists impair monocyte-derived dendritic cell differentiation and maturation. *J. Leukoc. Biol.* 81, 221–228.

Athar, M., Hasan, S.K., Srivastava, R.C., 1987. Evidence for the involvement of hydroxyl radicals in nickel mediated enhancement of lipid peroxidation: implications for nickel carcinogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147, 1276–1281.

Aw Yeang, H.X., Hamdam, J.M., Al-Huseini, L.M., Sethu, S., Djouhri, L., Walsh, J., Kitteringham, N., Park, B.K., Goldring, C.E., Sathish, J.G., n.d. Loss of transcription factor nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related factor-2 (Nrf2) leads to dysregulation of immune functions, redox homeostasis, and intracellular signaling in dendritic cells. *J Biol Chem* 287, 10556–10564.

B.

Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S.C., Alessi, D.R., Cohen, P., 2007. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.* 408, 297–315.

Baird, L., Dinkova-Kostova, A.T., 2011. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol* 85, 241–272.

Baird, L., Llères, D., Swift, S., Dinkova-Kostova, A.T., 2013. Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 15259–64.

Baird, L., Swift, S., Llères, D., Dinkova-Kostova, A.T., 2014. Monitoring Keap1-Nrf2 interactions in single live cells. *Biotechnol. Adv.* 32, 1133–44.

Bakdash, G., Sittig, S.P., van Dijk, T., Figdor, C.G., de Vries, I.J.M., 2013. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. *Front. Immunol.* 4, 1–18.

- Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252.
- Bangert, C., Brunner, P.M., Stingl, G., 2011. Immune functions of the skin. *Clin. Dermatol.* 29, 360–376.
- Baron, J.M., Höller, D., Schiffer, R., Frankenberg, S., Neis, M., Merk, H.F., Jugert, F.K., 2001. Expression of multiple cytochrome p450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 116, 541–548.
- Baroni, M., Pizzirani, C., Pinotti, M., Ferrari, D., Adinolfi, E., Calzavarini, S., Caruso, P., Bernardi, F., Di Virgilio, F., 2007. Stimulation of P2 (P2X7) receptors in human dendritic cells induces the release of tissue factor-bearing microparticles. *FASEB J.* 21, 1926–1933.
- Basketter, D., Doms-Goossens, A., Karlberg, A.T., Lepoittevin, J.P., 1995. The chemistry of contact allergy: why is a molecule allergenic? *Contact Dermatitis* 32, 65–73.
- Basketter, D., Doms-Goossens, A., Karlberg, A.T., Lepoittevin, J.P., 1995. The chemistry of contact allergy: Why is a molecule allergenic? *Contact Dermatitis* 32, 65–73.
- Basketter, D., Pendlington, R., Sarll, A., Scholes, E., 1996. The role of P4501A1 in the activation of prohaptens in skin sensitization. *J. Invest. Dermatol.* 1, 915.
- Berg, E.L., Yoshino, T., Rott, L.S., Robinson, M.K., Warnock, R.A., Kishimoto, T.K., Picker, L.J., Butcher, E.C., 1991. The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J. Exp. Med.* 174, 1461–1466.
- Bickers, D.R., Athar, M., 2006. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J. Invest. Dermatol.* 126, 2565–2575.
- Biedermann, T., Kneilling, M., Mailhammer, R., Maier, K., Sander, C.A., Kollias, G., Kunkel, S.L., Hültner, L., Röcken, M., 2000. Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *J. Exp. Med.* 192, 1441–1452.
- Bigley, V., McGovern, N., Milne, P., Dickinson, R., Pagan, S., Cookson, S., Haniffa, M., Collin, M., 2014. Langerin-expressing dendritic cells in human tissues are related to CD1c+ dendritic cells and distinct from Langerhans cells and CD141high XCR1+ dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 97, 627–634.
- Blank, V., 2008. Small Maf Proteins in Mammalian Gene Control: Mere Dimerization Partners or Dynamic Transcriptional Regulators? *J. Mol. Biol.* 376, 913–925.
- Bobr, A., Olvera-Gomez, I., Igyarto, B.Z., Haley, K.M., Hogquist, K.A., Kaplan, D.H., 2010. Acute ablation of Langerhans cells enhances skin immune responses. *J. Immunol.* 185, 4724–4728.
- Boesch-Saadatmandi, C., Wagner, A.E., Graeser, A.C., Hundhausen, C., Wolfram, S., Rimbach, G., 2009. Ochratoxin A impairs Nrf2-dependent gene expression in porcine kidney tubulus cells. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 93, 547–554.
- Boislevé, F., Kerdine-Romer, S., Pallardy, M., 2005. Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF- α . *Toxicology* 206, 233–244.
- Boislevé, F., Kerdine-Romer, S., Rougier-Larzat, N., Pallardy, M., 2004. Nickel and DNCB induce CCR7 expression on human dendritic cells through different signalling pathways: role of TNF- α and MAPK. *J. Invest. Dermatol.* 123, 494–502.

- Bond, E., Adams, W.C., Smed-Sørensen, A., Sandgren, K.J., Perbeck, L., Hofmann, A., Andersson, J., Loré, K., 2009. Techniques for time-efficient isolation of human skin dendritic cell subsets and assessment of their antigen uptake capacity. *J. Immunol. Methods* 348, 42–56.
- Bondeson, J., Sundler, R., 1995. Auranofin inhibits the induction of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha mRNA in macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 50, 1753–1759.
- Bouaziz, J.D., Yanaba, K., Tedder, T.F., 2008. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunol. Rev.* 224, 201–214.
- Boulloc, A., Cavani, A., Katz, S.I., 1998. Contact hypersensitivity in MHC class II-deficient mice depends on CD8 T lymphocytes primed by immunostimulating Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 111, 44–49.
- Bour, H., Peyron, E., Gaucherand, M., Garrigue, J.L., Desvignes, C., Kaiserlian, D., Revillard, J.P., Nicolas, J.F., 1995. Major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ T cells and class II-restricted CD4+ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur. J. Immunol.* 25, 3006–3010.
- Bourdonnay, E., Morzadec, C., Fardel, O., Vernhet, L., 2009. Redox-sensitive regulation of gene expression in human primary macrophages exposed to inorganic arsenic. *J Cell Biochem* 107, 537–547.
- Braun, S., Hanselmann, C., Gassmann, M.G., auf dem Keller, U., Born-Berclaz, C., Chan, K., Kan, Y.W., Werner, S., 2002. Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5492–5505.
- Brennan, M.S., Matos, M.F., Li, B., Hronowski, X., Gao, B., Juhasz, P., Rhodes, K.J., Scannevin, R.H., 2015. Dimethyl Fumarate and Monoethyl Fumarate Exhibit Differential Effects on KEAP1, NRF2 Activation, and Glutathione Depletion In Vitro. *PLoS One* 10, e0120254.
- Brusko, T.M., Wasserfall, C.H., Agarwal, A., Kapturczak, M.H., Atkinson, M.A., 2005. An integral role for heme oxygenase-1 and carbon monoxide in maintaining peripheral tolerance by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 174, 5181–5186.
- Burnet, F.M., Fenner, F., 1949. The Production of Antibodies, *J Immunol.*
- Byamba, D., Kim, T.G., Kim, D.H., Je, J.H., Lee, M.G., 2010. The Roles of Reactive Oxygen Species Produced by Contact Allergens and Irritants in Monocyte-derived Dendritic Cells. *Ann Dermatol* 22, 269–278.

C.

- Cai, Y., Shen, X., Ding, C., Qi, C., Li, K., Li, X., Jala, V.R., Zhang, H. ge, Wang, T., Zheng, J., Yan, J., 2011. Pivotal Role of Dermal IL-17-Producing $\gamma\delta$ T Cells in Skin Inflammation. *Immunity* 35, 596–610.
- Campbell, J.J., Haraldsen, G., Pan, J., Rottman, J., Qin, S., Ponath, P., Andrew, D.P., Warnke, R., Ruffing, N., Kassam, N., Wu, L., Butcher, E.C., 1999. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* 400, 776–780.
- Campos, R.A., Szczepanik, M., Lisbonne, M., Itakura, A., Leite-de-Moraes, M., Askenase, P.W., 2006. Invariant NKT cells rapidly activated via immunization with diverse contact antigens collaborate in vitro with B-1 cells to initiate contact sensitivity. *J. Immunol.* 177, 3686–3694.

- Carbone, T., Nasorri, F., Pennino, D., Eyerich, K., Foerster, S., Cifaldi, L., Traidl-Hoffman, C., Behrendt, H., Cavani, A., 2010. CD56highCD16-CD62L- NK cells accumulate in allergic contact dermatitis and contribute to the expression of allergic responses. *J. Immunol.* 184, 1102–1110.
- Cavani, A., De Pità, O., Girolomoni, G., 2007. New aspects of the molecular basis of contact allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 7, 404–408.
- Cavani, A., Nasorri, F., Ottaviani, C., Sebastiani, S., De Pità, O., Girolomoni, G., 2003a. Human CD25+ regulatory T cells maintain immune tolerance to nickel in healthy, nonallergic individuals. *J. Immunol.* 171, 5760–5768.
- Cavani, A., Ottaviani, C., Nasorri, F., Sebastiani, S., Girolomoni, G., 2003b. Immunoregulation of hapten and drug induced immune reactions. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 3, 243–247.
- Chen, A.I., McAdam, A.J., Buhlmann, J.E., Scott, S., Lupher, M.L., Greenfield, E.A., Baum, P.R., Fanslow, W.C., Calderhead, D.M., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., 1999. Ox40-ligand has a critical costimulatory role in dendritic cell:T cell interactions. *Immunity* 11, 689–698.
- Chen, G., Shaw, M.H., Kim, Y.-G., Nuñez, G., 2009. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu. Rev. Pathol.* 4, 365–398.
- Chen, L., 2004. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 336–47.
- Chen, L., Flies, D.B., 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 227–42.
- Chen, W., Sun, Z., Wang, X.J., Jiang, T., Huang, Z., Fang, D., Zhang, D.D., 2009. Direct Interaction between Nrf2 and p21Cip1/WAF1 Upregulates the Nrf2-Mediated Antioxidant Response. *Mol. Cell* 34, 663–673.
- Cher, D.J., Mosmann, T.R., 1987. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J. Immunol.* 138, 3688–3694.
- Cheung, T.C., Steinberg, M.W., Osborne, L.M., Macauley, M.G., Fukuyama, S., Sanjo, H., D’Souza, C., Norris, P.S., Pfeffer, K., Murphy, K.M., Kronenberg, M., Spear, P.G., Ware, C.F., 2009. Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 6244–6249.
- Chipinda, I., Hettick, J.M., Siegel, P.D., 2011. Haptenation: chemical reactivity and protein binding. *J. Allergy* 2011, 839682.
- Christensson, J.B., Matura, M., Bäcktorp, C., Börje, A., Nilsson, J.L.G., Karlberg, A.T., 2006. Hydroperoxides form specific antigens in contact allergy. *Contact Dermatitis* 55, 230–237.
- Chu, C.-C., Di Meglio, P., Nestle, F.O., 2011. Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. *Semin. Immunol.* 23, 28–41.
- Clark, R.A., 2010. Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. *J. Invest. Dermatol.* 130, 362–370.
- Clark, R.A., Chong, B., Mirchandani, N., Brinster, N.K., Yamanaka, K.-I., Dowgiert, R.K., Kupper, T.S., 2006. The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *J. Immunol.* 176, 4431–4439.
- Clark, R.A., Kupper, T.S., 2007. IL-15 and dermal fibroblasts induce proliferation of natural regulatory T cells isolated from human skin. *Blood* 109, 194–202.

- Clark, T.A., Lee, H.P., Rolston, R.K., Zhu, X., Marlatt, M.W., Castellani, R.J., Nunomura, A., Casadesus, G., Smith, M.A., Lee, H.G., Perry, G., 2010. Oxidative Stress and its Implications for Future Treatments and Management of Alzheimer Disease. *Int J Biomed Sci* 6, 225–227.
- Copple, I.M., Goldring, C.E., Kitteringham, N.R., Park, B.K., 2010. The keap1-nrf2 cellular defense pathway: mechanisms of regulation and role in protection against drug-induced toxicity. *Handb Exp Pharmacol* 233–266.
- Copple, I.M., Lister, A., Obeng, A.D., Kitteringham, N.R., Jenkins, R.E., Layfield, R., Foster, B.J., Goldring, C.E., Park, B.K., 2010. Physical and functional interaction of sequestosome 1 with Keap1 regulates the Keap1-Nrf2 cell defense pathway. *J. Biol. Chem.* 285, 16782–8.
- Corsini, E., Galbiati, V., Nikitovic, D., Tsatsakis, A.M., 2013. Role of oxidative stress in chemical allergens induced skin cells activation. *Food Chem. Toxicol.* 61, 74–81.
- Cottrez, F., Boitel, E., Auriault, C., Aebly, P., Groux, H., 2015. Genes specifically modulated in sensitized skins allow the detection of sensitizers in a reconstructed human skin model. Development of the SENS-IS assay. *Toxicol. Vitro.* 29, 787–802.
- Coyle, A.J., Lehar, S., Lloyd, C., Tian, J., Delaney, T., Manning, S., Nguyen, T., Burwell, T., Schneider, H., Gonzalo, J.A., Gosselin, M., Owen, L.R., Rudd, C.E., Gutierrez-Ramos, J.C., 2000. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 13, 95–105.
- Croft, B.M., Carter, L., Swain, S.L., Dutton, R.W., 1994. Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. *J. Exp. Med.* 180, 1715–28.
- Crotzer, V.L., Blum, J.S., 2010. Autophagy and adaptive immunity. *Immunology* 131, 9–17.
- Cumberbatch, M., Dearman, R.J., Kimber, I., 1997. Interleukin 1 beta and the stimulation of Langerhans cell migration: comparisons with tumour necrosis factor alpha. *Arch. Dermatol. Res.* 289, 277–84.
- D.**
- D’Autreaux, B., Toledano, M.B., 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 813–824.
- Danis, V.A., Millington, M., Hyland, V.J., Grennan, D., 1995. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin. Exp. Immunol.* 99, 303–310.
- De Smedt, A.C.A., Van Den Heuvel, R.L., Van Tendeloo, V.F.I., Berneman, Z.N., Schoeters, G.E.R., 2005. Capacity of CD34+ progenitor-derived dendritic cells to distinguish between sensitizers and irritants. *Toxicol. Lett.* 156, 377–389.
- De Smedt, A.C.A., Van Den Heuvel, R.L., Zwi Berneman, N., Schoeters, G.E.R., 2001. Modulation of phenotype, cytokine production and stimulatory function of CD34+ derived DC by NiCl₂ and SDS, in: *Toxicology in Vitro*. pp. 319–325.
- Dearman, R.J., Smith, S., Basketter, D.A., Kimber, I., 1997. Classification of chemical allergens according to cytokine secretion profiles of murine lymph node cells. *J. Appl. Toxicol.* 17, 53–62.

- Delattre, J., Bonnefont-Rousselot, D., Beaudoux, J.-L., 2005. Radicaux libres et stress oxydant - Aspects biologiques et pathologiques.
- deLuca, L.S., Gommerman, J.L., 2012. Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 339–51.
- Denoeud, J., Moser, M., 2011. Role of CD27/CD70 pathway of activation in immunity and tolerance. *J. Leukoc. Biol.* 89, 195–203.
- Dey, N., Szczepanik, M., Lau, K., Majewska-Szczepanik, M., Askenase, P.W., 2011. Stimulatory lipids accumulate in the mouse liver within 30min of contact sensitization to facilitate the activation of naïve iNKT cells in a CD1d-dependent fashion. *Scand. J. Immunol.* 74, 52–61.
- Dias, V., Junn, E., Mouradian, M.M., 2013. The role of oxidative stress in parkinson's disease. *J. Parkinsons. Dis.* 3, 461–491.
- Dinkova-Kostova, A.T., Talalay, P., 2008. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 128–38.
- Divkovic, M., Pease, C.K., Gerberick, G.F., Basketter, D.A., 2005. Hapten-protein binding: from theory to practical application in the in vitro prediction of skin sensitization. *Contact Dermatitis* 53, 189–200.
- Divkovic, M., Pease, C.K., Gerberick, G.F., Basketter, D.A., 2005. Hapten-protein binding: From theory to practical application in the in vitro prediction of skin sensitization. *Contact Dermatitis* 53, 189–200.
- Dlakić, M., Grinberg, A. V., Leonard, D.A., Kerppola, T.K., 2001. DNA sequence-dependent folding determines the divergence in binding specificities between Maf and other bZIP proteins. *EMBO J.* 20, 828–840.
- Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V.A., Celis, E., Chen, L., 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* 8, 793–800.
- Dréno, B., 2009. Anatomy and physiology of skin and cutaneous annexes. *Ann. Dermatol. Venereol.* 136 Suppl , S247–S251.
- Dubois, B., Chapat, L., Goubier, A., Papiernik, M., Nicolas, J.F., Kaiserlian, D., 2003. Innate CD4+CD25+ regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8+ T cells mediating skin inflammation. *Blood* 102, 3295–3301.
- Dudda, J.C., Simon, J.C., Martin, S., 2004. Dendritic cell immunization route determines CD8+ T cell trafficking to inflamed skin: role for tissue microenvironment and dendritic cells in establishment of T cell-homing subsets. *J. Immunol.* 172, 857–863.
- Dudeck, A., Dudeck, J., Scholten, J., Petzold, A., Surianarayanan, S., Köhler, A., Peschke, K., Vöhringer, D., Waskow, C., Krieg, T., Müller, W., Waisman, A., Hartmann, K., Gunzer, M., Roers, A., 2011. Mast Cells Are Key Promoters of Contact Allergy that Mediate the Adjuvant Effects of Haptens. *Immunity* 34, 973–984.
- Dyring-Andersen, B., Skov, L., Løvendorf, M.B., Bzorek, M., Søndergaard, K., Lauritsen, J.P.H., Dabelsteen, S., Geisler, C., Menné Bonefeld, C., 2013. CD4+ T cells producing interleukin (IL)-17, IL-22 and interferon-γ are major effector T cells in nickel allergy. *Contact Dermatitis* 68, 339–347.

E.

- Eades, G., Yang, M., Yao, Y., Zhang, Y., Zhou, Q., 2011. miR-200a regulates Nrf2 activation by targeting Keap1 mRNA in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 286, 40725–40733.
- Egawa, M., Mukai, K., Yoshikawa, S., Iki, M., Mukaida, N., Kawano, Y., Minegishi, Y., Karasuyama, H., 2013. Inflammatory Monocytes Recruited to Allergic Skin Acquire an Anti-inflammatory M2 Phenotype via Basophil-Derived Interleukin-4. *Immunity* 38, 570–580.
- Eggler, A.L., Small, E., Hannink, M., Mesecar, A.D., 2009. Cul3-mediated Nrf2 ubiquitination and antioxidant response element (ARE) activation are dependent on the partial molar volume at position 151 of Keap1. *Biochem. J.* 422, 171–180.
- Egner, P.A., Chen, J.G., Wang, J.B., Wu, Y., Sun, Y., Lu, J.H., Zhu, J., Zhang, Y.H., Chen, Y.S., Friesen, M.D., Jacobson, L.P., Muñoz, A., Ng, D., Qian, G.S., Zhu, Y.R., Chen, T.Y., Botting, N.P., Zhang, Q., Fahey, J.W., Talalay, P., Groopman, J.D., Kensler, T.W., 2011. Bioavailability of sulforaphane from two broccoli sprout beverages: Results of a short-term, cross-over clinical trial in Qidong, China. *Cancer Prev. Res.* 4, 384–395.
- El Ali, Z., Gerbeix, C., Hemon, P., Esser, P.R., Martin, S.F., Pallardy, M., Kerdine-Romer, S., 2013. Allergic skin inflammation induced by chemical sensitizers is controlled by the transcription factor Nrf2. *Toxicol Sci* 134, 39–48.
- Engeman, T., Gorbachev, A. V., Kish, D.D., Fairchild, R.L., 2004. The intensity of neutrophil infiltration controls the number of antigen-primed CD8 T cells recruited into cutaneous antigen challenge sites. *J. Leukoc. Biol.* 76, 941–949.
- Erdmann, I., Scheidegger, E.P., Koch, F.K., Heinzerling, L., Odermatt, B., Burg, G., Lowe, J.B., Kündig, T.M., 2002. Fucosyltransferase VII-deficient mice with defective E-, P-, and L-selectin ligands show impaired CD4+ and CD8+ T cell migration into the skin, but normal extravasation into visceral organs. *J. Immunol.* 168, 2139–2146.
- Esser, P.R., Wölfle, U., Dürr, C., von Loewenich, F.D., Schempp, C.M., Freudenberg, M.A., Jakob, T., Martin, S.F., 2012. Contact sensitizers induce skin inflammation via ROS production and hyaluronic acid degradation. *PLoS One* 7.
- Eyerich, S., Zielinski, C.E., 2014. Defining Th-cell subsets in a classical and tissue-specific manner: Examples from the skin. *Eur. J. Immunol.* 44, 3475–83.

F.

- Förster, R., Braun, A., Worbs, T., 2012. Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics. *Trends Immunol.* 33, 271–280.
- Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., Lipp, M., 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99, 23–33.
- Foster, C.A., Yokozeki, H., Rappersberger, K., Koning, F., Volc-Platzter, B., Rieger, A., Coligan, J.E., Wolff, K., Stingl, G., 1990. Human epidermal T cells predominantly belong to the lineage expressing alpha/beta T cell receptor. *J. Exp. Med.* 171, 997–1013.

Frugé, R.E., Krout, C., Lu, R., Matsushima, H., Takashima, A., 2012. Real-Time Visualization of Macromolecule Uptake by Epidermal Langerhans Cells in Living Animals. *J. Invest. Dermatol.* 132, 609–614.

Fukao, T., Koyasu, S., 2003. PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol.* 24, 358–363.

Fukunaga, A., Khaskhely, N.M., Ma, Y., Sreevidya, C.S., Taguchi, K., Nishigori, C., Ullrich, S.E., 2010. Langerhans cells serve as immunoregulatory cells by activating NKT cells. *J. Immunol.* 185, 4633–4640.

G.

Galli, S.J., Kalesnikoff, J., Grimbaldston, M.A., Piliponsky, A.M., Williams, C.M.M., Tsai, M., 2005. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 749–786.

Gallucci, S., Matzinger, P., 2001. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 13, 114–119.

Gamerding, K., Moulon, C., Karp, D.R., Van Bergen, J., Koning, F., Wild, D., Pflugfelder, U., Weltzien, H.U., 2003. A new type of metal recognition by human T cells: contact residues for peptide-independent bridging of T cell receptor and major histocompatibility complex by nickel. *J. Exp. Med.* 197, 1345–1353.

Gao, B., Doan, A., Hybertson, B.M., 2014. The clinical potential of influencing Nrf2 signaling in degenerative and immunological disorders. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* 6, 19–34.

Gao, Y., Nish, S. a, Jiang, R., Hou, L., Licona-Limón, P., Weinstein, J.S., Zhao, H., Medzhitov, R., 2013. Control of T helper 2 responses by transcription factor IRF4-dependent dendritic cells. *Immunity* 39, 722–32.

Gęgotek, A., Skrzydlewska, E., 2015. The role of transcription factor Nrf2 in skin cells metabolism. *Arch. Dermatol. Res.* 307, 385–96.

Geisel, J., Brück, J., Glocova, I., Dengler, K., Sinnberg, T., Rothfuss, O., Walter, M., Schulze-Osthoff, K., Röcken, M., Ghoreschi, K., 2014. Sulforaphane protects from T cell-mediated autoimmune disease by inhibition of IL-23 and IL-12 in dendritic cells. *J. Immunol.* 192, 3530–9.

Gerberick, G.F., Vassallo, J.D., Foertsch, L.M., Price, B.B., Chaney, J.G., Lepoittevin, J.P., 2007. Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. *Toxicol. Sci.* 97, 417–427.

Girardi, M., Lewis, J., Glusac, E., Filler, R.B., Geng, L., Hayday, A.C., Tigelaar, R.E., 2002. Resident skin-specific gammadelta T cells provide local, nonredundant regulation of cutaneous inflammation. *J. Exp. Med.* 195, 855–867.

Gober, M.D., Fischelevich, R., Zhao, Y., Unutmaz, D., Gaspari, A.A., 2008. Human natural killer T cells infiltrate into the skin at elicitation sites of allergic contact dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 128, 1460–1469.

Gocinski, B.L., Tigelaar, R.E., 1990. Roles of CD4+ and CD8+ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *J. Immunol.* 144, 4121–4128.

Goebeler, M., Trautmann, A., Voss, A., Bröcker, E. V, Toksoy, A., Gillitzer, R., 2001. Differential and sequential expression of multiple chemokines during elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Am. J. Pathol.* 158, 431–440.

- Gomez de Agüero, M., Vocanson, M., Hacini-Rachinel, F., Taillardet, M., Sparwasser, T., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Kaiserlian, D., Dubois, B., 2012. Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8(+) T cells and activating Foxp3(+) regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* 122, 1700–11.
- Goossens, A., 2011. Contact-allergic reactions to cosmetics. *J. Allergy* 2011, 467071.
- Gorbachev, A. V, Dilulio, N.A., Fairchild, R.L., 2001. IL-12 augments CD8+ T cell development for contact hypersensitivity responses and circumvents anti-CD154 antibody-mediated inhibition. *J. Immunol.* 167, 156–162.
- Gorbachev, A. V, Fairchild, R.L., 2001. Induction and regulation of T-cell priming for contact hypersensitivity. *Crit. Rev. Immunol.* 21, 451–472.
- Goubier, A., Vocanson, M., Macari, C., Poyet, G., Herbelin, A., Nicolas, J.-F., Dubois, B., Kaiserlian, D., 2013. Invariant NKT cells suppress CD8(+) T-cell-mediated allergic contact dermatitis independently of regulatory CD4(+) T cells. *J. Invest. Dermatol.* 133, 980–7.
- Goven, D., Boutten, A., Leçon-Malas, V., Marchal-Sommé, J., Amara, N., Crestani, B., Fournier, M., Lesèche, G., Soler, P., Boczkowski, J., Bonay, M., 2008. Altered Nrf2/Keap1-Bach1 equilibrium in pulmonary emphysema. *Thorax* 63, 916–924.
- Grabbe, S., Steinert, M., Mahnke, K., Schwarz, A., Luger, T. a., Schwarz, T., 1996. Dissection of antigenic and irritative effects of epicutaneously applied haptens in mice: Evidence that not the antigenic component but nonspecific proinflammatory effects of haptens determine the concentration-dependent elicitation of allergic contact de. *J. Clin. Invest.* 98, 1158–1164.
- Green, J.M., Noel, P.J., Sperling, A.I., Walunas, T.L., Gray, G.S., Bluestone, J.A., Thompson, C.B., 1994. Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice. *Immunity* 1, 501–508.
- Greenwald, R.J., Boussiotis, V.A., Lorschach, R.B., Abbas, A.K., Sharpe, A.H., 2001. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* 14, 145–155.
- Gregori, S., Tomasoni, D., Pacciani, V., Scirpoli, M., Battaglia, M., Magnani, C.F., Hauben, E., Roncarolo, M.G., 2010. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* 116, 935–944.
- Grimbaldeston, M.A., Nakae, S., Kalesnikoff, J., Tsai, M., Galli, S.J., 2007. Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat. Immunol.* 8, 1095–1104.
- Gros, E., Novak, N., 2012. Cutaneous dendritic cells in allergic inflammation. *Clin. Exp. Allergy* 42, 1161–1175.
- Guilliams, M., Crozat, K., Henri, S., Tamoutounour, S., Grenot, P., Devilard, E., De Bovis, B., Alexopoulou, L., Dalod, M., Malissen, B., 2010. Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103- dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3 + regulatory T cells. *Blood* 115, 1958–1968.

H.

- Habif, T.P., Campbell, J.I.J., Dinulos, J.G.H., Chapman, M.S., Zug, K.A., Lorette, G., 2012. *Maladies cutanées, diagnostic et traitement*, Elsevier M. ed.

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280, 1–8.
- Hancock, W.W., Buelow, R., Sayegh, M.H., Turka, L.A., 1998. Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes. *Nat. Med.* 4, 1392–1396.
- Haniffa, M., Gunawan, M., Jardine, L., 2015. Human skin dendritic cells in health and disease. *J. Dermatol. Sci.* 77, 85–92.
- Hardison, S.E., Brown, G.D., 2012. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat. Immunol.* 13, 817–822.
- Hayes, J.D., McMahon, M., Chowdhry, S., Dinkova-Kostova, A.T., 2010. Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 1713–1748.
- He, C.H., Gong, P., Hu, B., Stewart, D., Choi, M.E., Choi, A.M.K., Alam, J., 2001. Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *J. Biol. Chem.* 276, 20858–20865.
- He, D., Wu, L., Kim, H.K., Li, H., Elmets, C.A., Xu, H., 2009. IL-17 and IFN-gamma mediate the elicitation of contact hypersensitivity responses by different mechanisms and both are required for optimal responses. *J. Immunol.* 183, 1463–1470.
- He, D., Wu, L., Kim, H.K., Li, H., Elmets, C.A., Xu, H., 2006. CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J. Immunol.* 177, 6852–6858.
- He, X., Chen, M.G., Ma, Q., 2008. Activation of Nrf2 in defense against cadmium-induced oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 1375–1383.
- He, X., Ma, Q., 2009. NRF2 cysteine residues are critical for oxidant/electrophile-sensing, Kelch-like ECH-associated protein-1-dependent ubiquitination-proteasomal degradation, and transcription activation. *Mol. Pharmacol.* 76, 1265–1278.
- Hitzler, M., Majdic, O., Heine, G., Worm, M., Ebert, G., Luch, A., Peiser, M., 2012. Human Langerhans Cells Control Th Cells via Programmed Death-Ligand 1 in Response to Bacterial Stimuli and Nickel-Induced Contact Allergy. *PLoS One* 7, 46776.
- Hoetzenecker, W., Echtenacher, B., Guenova, E., Hoetzenecker, K., Woelbing, F., Brück, J., Teske, A., Valtcheva, N., Fuchs, K., Kneilling, M., Park, J.-H., Kim, K.-H., Kim, K.-W., Hoffmann, P., Krenn, C., Hai, T., Ghoreschi, K., Biedermann, T., Röcken, M., 2011. ROS-induced ATF3 causes susceptibility to secondary infections during sepsis-associated immunosuppression. *Nat. Med.* 18, 128–134.
- Homey, B., Alenius, H., Müller, A., Soto, H., Bowman, E.P., Yuan, W., McEvoy, L., Lauerma, A.I., Assmann, T., Bünemann, E., Lehto, M., Wolff, H., Yen, D., Marxhausen, H., To, W., Sedgwick, J., Ruzicka, T., Lehmann, P., Zlotnik, A., 2002. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat. Med.* 8, 157–165.
- Honda, T., Egawa, G., Grabbe, S., Kabashima, K., 2012. Update of Immune Events in the Murine Contact Hypersensitivity Model: Toward the Understanding of Allergic Contact Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 133, 303–15.
- Hong, F., Sekhar, K.E., Freeman, M.L., Liebler, D.C., 2005. Specific patterns of electrophile adduction trigger Keap1 ubiquitination and Nrf2 activation. *J. Biol. Chem.* 280, 31768–31775.

- Hu, C., Eggler, A.L., Mesecar, A.D., Van Breemen, R.B., 2011. Modification of Keap1 cysteine residues by sulforaphane. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 515–521.
- Huang, H.C., Nguyen, T., Pickett, C.B., 2000. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12475–12480.
- Hur, W., Gray, N.S., 2011. Small molecule modulators of antioxidant response pathway. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 162–173.
- Hybertson, B.M., Gao, B., 2014. Role of the Nrf2 signaling system in health and disease. *Clin. Genet.* 86, 447–52.

I.

- Ichimura, Y., Waguri, S., Sou, Y. shin, Kageyama, S., Hasegawa, J., Ishimura, R., Saito, T., Yang, Y., Kouno, T., Fukutomi, T., Hoshii, T., Hirao, A., Takagi, K., Mizushima, T., Motohashi, H., Lee, M.S., Yoshimori, T., Tanaka, K., Yamamoto, M., Komatsu, M., 2013. Phosphorylation of p62 Activates the Keap1-Nrf2 Pathway during Selective Autophagy. *Mol. Cell* 51, 618–631.
- Igyarto, B.Z., Jenison, M.C., Dudda, J.C., Roers, A., Müller, W., Koni, P.A., Campbell, D.J., Shlomchik, M.J., Kaplan, D.H., 2009. Langerhans cells suppress contact hypersensitivity responses via cognate CD4 interaction and langerhans cell-derived IL-10. *J. Immunol.* 183, 5085–5093.
- Im, J.Y., Lee, K.W., Woo, J.M., Junn, E., Mouradian, M.M., 2012. Dj-1 induces thioredoxin 1 expression through the Nrf2 pathway. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3013–3024.
- Itakura, A., Szczepanik, M., Campos, R.A., Paliwal, V., Majewska, M., Matsuda, H., Takatsu, K., Askenase, P.W., 2005. An hour after immunization peritoneal B-1 cells are activated to migrate to lymphoid organs where within 1 day they produce IgM antibodies that initiate elicitation of contact sensitivity. *J. Immunol.* 175, 7170–7178.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., Nabeshima, Y., 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 313–322.

J.

- Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Larsen, K.B., Awuh, J.A., Øvervatn, A., McMahon, M., Hayes, J.D., Johansen, T., 2010. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J. Biol. Chem.* 285, 22576–22591.
- Jain, A.K., Jaiswal, A.K., 2007. GSK-3 β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *J. Biol. Chem.* 282, 16502–16510.
- Jain, A.K., Jaiswal, A.K., 2006. Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. *J Biol Chem* 281, 12132–12142.
- Jain, A.K., Mahajan, S., Jaiswal, A.K., 2008. Phosphorylation and dephosphorylation of tyrosine 141 regulate stability and degradation of INrf2: A novel mechanism in Nrf2 activation. *J. Biol. Chem.* 283, 17712–17720.

- Jiang, A., Bloom, O., Ono, S., Cui, W., Unternaehrer, J., Jiang, S., Whitney, J.A., Connolly, J., Banchereau, J., Mellman, I., 2007. Disruption of E-Cadherin-Mediated Adhesion Induces a Functionally Distinct Pathway of Dendritic Cell Maturation. *Immunity* 27, 610–624.
 - Jiang, T., Tian, F., Zheng, H., Whitman, S.A., Lin, Y., Zhang, Z., Zhang, N., Zhang, D.D., 2014. Nrf2 suppresses lupus nephritis through inhibition of oxidative injury and the NF-kappaB-mediated inflammatory response. *Kidney Int* 85, 333–343.
 - Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., Amigorena, S., 2012. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 557–569.
 - Johnson, D.A., Amirahmadi, S., Ward, C., Fabry, Z., Johnson, J.A., 2009. The absence of the pro-antioxidant transcription factor Nrf2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Toxicol. Sci.* 114, 237–246.
 - Jullien, D., Faure, M., 2000. Contact eczema. Etiology, physiopathology, diagnosis, treatment. *Rev Prat* 50, 61–68.
 - Jung, K.A., Kwak, M.K., 2010. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules* 15, 7266–7291.
- K.**
- Kaech, S.M., Cui, W., 2012. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 749–761.
 - Kaidery, N.A., Banerjee, R., Yang, L., Smirnova, N.A., Hushpalian, D.M., Liby, K.T., Williams, C.R., Yamamoto, M., Kensler, T.W., Ratan, R.R., Sporn, M.B., Beal, M.F., Gazaryan, I.G., Thomas, B., 2012. Targeting Nrf2-Mediated Gene Transcription by Extremely Potent Synthetic Triterpenoids Attenuate Dopaminergic Neurotoxicity in the MPTP Mouse Model of Parkinson’s Disease. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 139–57.
 - Kanerva, L., Tarvainen, K., Pinola, A., Leino, T., Granlund, H., Estlander, T., Jolanki, R., Forstrom, L., 1994. A single accidental exposure may result in a chemical burn, primary sensitization and allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 31, 229–235.
 - Kanitakis, J., Petruzzo, P., Dubernard, J.-M., 2004. Turnover of epidermal Langerhans’ cells. *N. Engl. J. Med.* 351, 2661–2.
 - Kaplan, D.H., Igyártó, B.Z., Gaspari, A.A., 2012. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 114–24.
 - Kapsenberg, M.L., 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3, 984–993.
 - Kapturczak, M.H., Wasserfall, C., Brusko, T., Campbell-Thompson, M., Ellis, T.M., Atkinson, M.A., Agarwal, A., 2004. Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *Am. J. Pathol.* 165, 1045–1053.
 - Karin, M., Greten, F.R., 2005. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 749–759.
 - Karin, M., Liu, Z.G., Zandi, E., 1997. AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 240–246.

- Karlberg, A.-T., Bergström, M.A., Börje, A., Luthman, K., Nilsson, J.L.G., 2008. Allergic contact dermatitis--formation, structural requirements, and reactivity of skin sensitizers. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 53–69.
- Karlberg, A.T., Börje, A., Duus Johansen, J., Lidén, C., Rastogi, S., Roberts, D., Uter, W., White, I.R., 2013. Activation of non-sensitizing or low-sensitizing fragrance substances into potent sensitizers - Prehaptens and prohaptens. *Contact Dermatitis* 69, 323–334.
- Karlenius, T.C., Tonissen, K.F., 2010. Thioredoxin and cancer: A role for thioredoxin in all states of tumor oxygenation. *Cancers (Basel)*. 2, 209–232.
- Kaspar, J.W., Jaiswal, A.K., 2011. Tyrosine phosphorylation controls nuclear export of Fyn, allowing Nrf2 activation of cytoprotective gene expression. *FASEB J.* 25, 1076–1087.
- Kaspar, J.W., Niture, S.K., Jaiswal, A.K., 2012. Antioxidant-induced INrf2 (Keap1) tyrosine 85 phosphorylation controls the nuclear export and degradation of the INrf2-Cul3-Rbx1 complex to allow normal Nrf2 activation and repression. *J. Cell Sci.* 125, 1027–1038.
- Kaspar, J.W., Niture, S.K., Jaiswal, A.K., 2009. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 1304–1309.
- Kato, M., Neil, T.K., Fearnley, D.B., McLellan, A.D., Vuckovic, S., Hart, D.N., 2000. Expression of multielectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cells. *Int. Immunol.* 12, 1511–1519.
- Katoh, Y., Itoh, K., Yoshida, E., Miyagishi, M., Fukamizu, A., Yamamoto, M., 2001. Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes to Cells* 6, 857–868.
- Kawai, T., Akira, S., 2007. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* 13, 460–469.
- Kawai, Y., Garduño, L., Theodore, M., Yang, J., Arinze, I.J., 2011. Acetylation-deacetylation of the transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) regulates its transcriptional activity and nucleocytoplasmic localization. *J. Biol. Chem.* 286, 7629–7640.
- Kehren, J., Desvignes, C., Krasteva, M., Ducluzeau, M.T., Assossou, O., Horand, F., Hahne, M., Kägi, D., Kaiserlian, D., Nicolas, J.F., 1999. Cytotoxicity is mandatory for CD8(+) T cell-mediated contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 189, 779–786.
- Kendall, R.T., Feghali-Bostwick, C.A., 2014. Fibroblasts in fibrosis: Novel roles and mediators. *Front. Pharmacol.* 5.
- Kensler, T.W., Egner, P.A., Agyeman, A.S., Visvanathan, K., Groopman, J.D., Chen, J.G., Chen, T.Y., Fahey, J.W., Talalay, P., 2013. Keap1-Nrf2 signaling: A target for cancer prevention by sulforaphane. *Top. Curr. Chem.* 329, 163–178.
- Keum, Y.S., Choi, B.Y., 2014. Molecular and chemical regulation of the keap1-Nrf2 signaling pathway. *Molecules* 19, 10074–10089.
- Keum, Y.-S., Han, Y.-H., Liew, C., Kim, J.-H., Xu, C., Yuan, X., Shakarjian, M.P., Chong, S., Kong, A.-N., 2006. Induction of heme oxygenase-1 (HO-1) and NAD[P]H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) by a phenolic antioxidant, butylated hydroxyanisole (BHA) and its metabolite, tert-butylhydroquinone (tBHQ) in primary-cultured human and rat hepatocytes. *Pharm. Res.* 23, 2586–94.
- Khor, T.O., Huang, M.T., Kwon, K.H., Chan, J.Y., Reddy, B.S., Kong, A.N., 2006. Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Cancer Res.* 66, 11580–11584.

- Kim, J., Cha, Y.N., Surh, Y.J., 2010. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 690, 12–23.
- Kim, J., Cha, Y.N., Surh, Y.J., 2009. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat Res* 690, 12–23.
- Kim, N.-H., Oh, M.-K., Park, H.J., Kim, I.-S., 2010. Auranofin, a Gold(I)-Containing Antirheumatic Compound, Activates Keap1/Nrf2 Signaling via Rac1/iNOS Signal and Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. *J. Pharmacol. Sci.* 113, 246–254.
- Kim, Y., Kim, B.H., Lee, H., Jeon, B., Lee, Y.S., Kwon, M.J., Kim, T.Y., 2011. Regulation of skin inflammation and angiogenesis by EC-SOD via HIF-1 α and NF- κ B pathways. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1985–1995.
- Kish, D.D., Gorbachev, A. V, Fairchild, R.L., 2005. CD8 $^{+}$ T cells produce IL-2, which is required for CD(4 $^{+}$)CD25 $^{+}$ T cell regulation of effector CD8 $^{+}$ T cell development for contact hypersensitivity responses. *J. Leukoc. Biol.* 78, 725–735.
- Kish, D.D., Li, X., Fairchild, R.L., 2009. CD8 T cells producing IL-17 and IFN- γ initiate the innate immune response required for responses to antigen skin challenge. *J. Immunol.* 182, 5949–5959.
- Kissenpfennig, A., Henri, S., Dubois, B., Laplace-Builhé, C., Perrin, P., Romani, N., Tripp, C.H., Douillard, P., Leserman, L., Kaiserlian, D., Saeland, S., Davoust, J., Malissen, B., 2005. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 22, 643–654.
- Kobayashi, E., Suzuki, T., Yamamoto, M., 2013. Roles Nrf2 plays in myeloid cells and related disorders. *Oxid. Med. Cell. Longev.* Article ID 529219.
- Kolesaric, A., Stingl, G., Elbe-Burger, A., 1997. MHC class I/II- dendritic cells induce hapten-specific immune responses in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol* 109, 580–585.
- Komai-Koma, M., Gilchrist, D.S., McKenzie, A.N.J., Goodyear, C.S., Xu, D., Liew, F.Y., 2011. IL-33 activates B1 cells and exacerbates contact sensitivity. *J. Immunol.* 186, 2584–2591.
- Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y.-S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K.I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., Yamamoto, M., 2010. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat. Cell Biol.* 12, 213–223.
- Kondo, S., Kooshesh, F., Wang, B., Fujisawa, H., Sauder, D.N., 1996. Contribution of the CD28 molecule to allergic and irritant-induced skin reactions in CD28 $^{-/-}$ mice. *J. Immunol.* 157, 4822–4829.
- Konishi, H., Tanaka, M., Takemura, Y., Matsuzaki, H., Ono, Y., Kikkawa, U., Nishizuka, Y., 1997. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11233–11237.
- Krieg, C., Boyman, O., Fu, Y.-X., Kaye, J., 2007. B and T lymphocyte attenuator regulates CD8 $^{+}$ T cell-intrinsic homeostasis and memory cell generation. *Nat. Immunol.* 8, 162–171.
- Krishnaswamy, J.K., Chu, T., Eisenbarth, S.C., 2013. Beyond pattern recognition: NOD-like receptors in dendritic cells. *Trends Immunol.* 34, 224–233.
- Kubo, A., Nagao, K., Yokouchi, M., Sasaki, H., Amagai, M., 2009. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J. Exp. Med.* 206, 2937–2946.

Kumari, S., Mg, S., Mayor, S., 2010. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res.* 20, 256–275.

Kwak, M.-K., Itoh, K., Yamamoto, M., Kensler, T.W., 2002. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2883–2892.

Kwak, M.-K., Wakabayashi, N., Greenlaw, J.L., Yamamoto, M., Kensler, T.W., 2003. Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8786–8794.

Kweon, M.H., Adhami, V.M., Lee, J.S., Mukhtar, H., 2006. Constitutive overexpression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3-gallate. *J. Biol. Chem.* 281, 33761–33772.

L.

Lachapelle, J.-M., Maibach, H.I., 2012. Patch Testing and Prick Testing, Third Edit. ed. A Practical Guide Official Publication of the ICDRG.

Lahoute, C., Herbin, O., Mallat, Z., Tedgui, A., 2011. Adaptive immunity in atherosclerosis: mechanisms and future therapeutic targets. *Nat. Rev. Cardiol.* 8, 348–358.

Lai, Y., Gallo, R.L., 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 30, 131–141.

Lambert, P.H., Laurent, P.E., 2008. Intradermal vaccine delivery: Will new delivery systems transform vaccine administration? *Vaccine* 26, 3197–3208.

Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y.-H., Homey, B., Cao, W., Wang, Y.-H., Su, B., Nestle, F.O., Zal, T., Mellman, I., Schröder, J.-M., Liu, Y.-J., Gilliet, M., 2007. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 449, 564–569.

Landsteiner, K., Jacob, J., 1935. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *J. Exp. Med.* 61-5, 643–657.

Lanzavecchia, A., 1996. Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 348–354.

Lebre, M.C., van der Aar, A.M.G., van Baarsen, L., van Capel, T.M.M., Schuitemaker, J.H.N., Kapsenberg, M.L., de Jong, E.C., 2007. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J. Invest. Dermatol.* 127, 331–341.

Lee, D.F., Kuo, H.P., Liu, M., Chou, C.K., Xia, W., Du, Y., Shen, J., Chen, C. Te, Huo, L., Hsu, M.C., Li, C.W., Ding, Q., Liao, T.L., Lai, C.C., Lin, A.C., Chang, Y.H., Tsai, S.F., Li, L.Y., Hung, M.C., 2009. KEAP1 E3 Ligase-Mediated Downregulation of NF- κ B Signaling by Targeting IKK β . *Mol. Cell* 36, 131–140.

Lee, J.M., Calkins, M.J., Chan, K., Kan, Y.W., Johnson, J.A., 2003. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J. Biol. Chem.* 278, 12029–12038.

- Lee, M.-S., Lee, B., Park, K.-E., Utsuki, T., Shin, T., Oh, C.W., Kim, H.-R., 2015. Dieckol enhances the expression of antioxidant and detoxifying enzymes by the activation of Nrf2-MAPK signalling pathway in HepG2 cells. *Food Chem.* 174, 538–46.
- Lee, Y.S., Cheon, I.-S., Kim, B.-H., Kwon, M.-J., Lee, H.-W., Kim, T.-Y., 2013. Loss of Extracellular Superoxide Dismutase Induces Severe IL-23-Mediated Skin Inflammation in Mice. *J. Invest. Dermatol.* 133, 732–41.
- Lepoittevin, J.P., 2006. Metabolism versus chemical transformation or pro- versus prehapten? *Contact Dermatitis* 54, 73–74.
- Levy, S., Jaiswal, A.K., Forman, H.J., 2009. The role of c-Jun phosphorylation in EpRE activation of phase II genes. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 1172–1179.
- Li, W., Khor, T.O., Xu, C., Shen, G., Jeong, W.S., Yu, S., Kong, A.N., 2008. Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NF-kappaB-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem Pharmacol* 76, 1485–1489.
- Li, W., Liu, H., Zhou, J. Sen, Cao, J.F., Zhou, X.B., Choi, A.M.K., Chen, Z.H., Shen, H.H., 2012. Caveolin-1 inhibits expression of antioxidant enzymes through direct interaction with nuclear erythroid 2 p45-related factor-2 (Nrf2). *J. Biol. Chem.* 287, 20922–20930.
- Li, W., Yu, S.W., Kong, A.N.T., 2006. Nrf2 possesses a redox-sensitive nuclear exporting signal in the Neh5 transactivation domain. *J. Biol. Chem.* 281, 27251–27263.
- Liston, A., Gray, D.H.D., 2014. Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 154–65.
- Liu, C., Chen, Y., Kochevar, I.E., Jurkunas, U. V, 2014. Decreased DJ-1 leads to impaired Nrf2-regulated antioxidant defense and increased UV-A-induced apoptosis in corneal endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 5551–60.
- Liu, J., Harberts, E., Tammaro, A., Girardi, N., Filler, R.B., Fischelevich, R., Temann, A., Licon-Limón, P., Girardi, M., Flavell, R. a, Gaspari, A. a, 2014. IL-9 Regulates Allergen-Specific Th1 Responses in Allergic Contact Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 1–9.
- Lo, S.C., Hannink, M., 2006. PGAM5, a Bcl-XL-interacting protein, is a novel substrate for the redox-regulated Keap1-dependent ubiquitin ligase complex. *J. Biol. Chem.* 281, 37893–37903.
- Löhning, M., Hutloff, A., Kallinich, T., Mages, H.W., Bonhagen, K., Radbruch, A., Hamelmann, E., Kroczeck, R.A., 2003. Expression of ICOS in vivo defines CD4+ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *J. Exp. Med.* 197, 181–193.
- Lu, H., Yang, D.D., Wysk, M., Gatti, E., Mellman, I., Davis, R.J., Flavell, R.A., 1999. Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3) -deficient mice 18, 1845–1857.
- Lu, S.C., 2013. Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3143–53.
- Luckey, U., Maurer, M., Schmidt, T., Lorenz, N., Seebach, B., Metz, M., Steinbrink, K., 2011. T cell killing by tolerogenic dendritic cells protects mice from allergy. *J. Clin. Invest.* 121, 3860–3871.
- Luckey, U., Schmidt, T., Pfender, N., Romer, M., Lorenz, N., Martin, S.F., Bopp, T., Schmitt, E., Nikolaev, A., Yogeve, N., Waisman, A., Jakob, T., Steinbrink, K., 2012a. Crosstalk of regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells prevents contact allergy in subjects with low zone tolerance. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130.
- Luckey, U., Schmidt, T., Pfender, N., Romer, M., Lorenz, N., Martin, S.F., Bopp, T., Schmitt, E., Nikolaev, A., Yogeve, N., Waisman, A., Jakob, T., Steinbrink, K., 2012b. Crosstalk of regulatory T cells and tolerogenic

dendritic cells prevents contact allergy in subjects with low zone tolerance. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130, 781–797.

Luo, C., Urgard, E., Vooder, T., Metspalu, A., 2011. The role of COX-2 and Nrf2/ARE in anti-inflammation and antioxidative stress: Aging and anti-aging. *Med. Hypotheses* 77, 174–178.

M.

Ma, Q., 2014. Merkel cells are a touchy subject. *Cell* 157, 531–533.

Ma, Q., He, X.Q., 2012. Molecular Basis of Electrophilic and Oxidative Defense: Promises and Perils of Nrf2. *Pharmacol. Rev.* 64, 1055–1081.

Macleod, a. K., McMahon, M., Plummer, S.M., Higgins, L.G., Penning, T.M., Igarashi, K., Hayes, J.D., 2009. Characterization of the cancer chemopreventive NRF2-dependent gene battery in human keratinocytes: Demonstration that the KEAP1-NRF2 pathway, and not the BACH1-NRF2 pathway, controls cytoprotection against electrophiles as well as redox-cycling compounds. *Carcinogenesis* 30, 1571–1580.

Macoch, M., Morzadec, C., Génard, R., Pallardy, M., Kerdine-Römer, S., Fardel, O., Vernhet, L., 2015. Nrf2-dependent repression of interleukin-12 expression in human dendritic cells exposed to inorganic arsenic. *Free Radic. Biol. Med.* 1–10.

Magesh, S., Chen, Y., Hu, L., 2012a. Small Molecule Modulators of Keap1-Nrf2-ARE Pathway as Potential Preventive and Therapeutic Agents. *Med. Res. Rev.* 32, 687–726.

Magesh, S., Chen, Y., Hu, L., 2012b. Small Molecule Modulators of Keap1-Nrf2-ARE Pathway as Potential Preventive and Therapeutic Agents. *Med. Res. Rev.*

Malhotra, D., Thimmulappa, R., Navas-Acien, A., Sandford, A., Elliott, M., Singh, A., Chen, L., Zhuang, X., Hogg, J., Pare, P., Tuder, R.M., Biswal, S., 2008. Expression of concern: Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 592–604.

Malissen, B., Tamoutounour, S., Henri, S., 2014. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 417–28.

Mallal, S., Nolan, D., Witt, C., Masel, G., Martin, A.M., Moore, C., Sayer, D., Castley, A., Mamotte, C., Maxwell, D., James, I., Christiansen, F.T., 2002. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet* 359, 727–732.

Martin, E., O'Sullivan, B., Low, P., Thomas, R., 2003. Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10. *Immunity* 18, 155–167.

Martin, S., Delattre, V., Leicht, C., Weltzien, H.-U., Simon, J.C., 2003. A high frequency of allergen-specific CD8⁺ Tc1 cells is associated with the murine immune response to the contact sensitizer trinitrophenyl. *Exp. Dermatol.* 12, 78–85.

Martin, S.F., 2015. New concepts in cutaneous allergy. *Contact Dermatitis* 72, 2–10.

Martin, S.F., 2012. Allergic contact dermatitis: xenoinflammation of the skin. *Curr Opin Immunol* 24, 720–729.

- Martin, S.F., 2004. T lymphocyte-mediated immune responses to chemical haptens and metal ions: Implications for allergic and autoimmune disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 134, 186–198.
- Martin, S.F., Dudda, J.C., Delattre, V., Bachtanian, E., Leicht, C., Burger, B., Weltzien, H.U., Simon, J.C., 2004. Fas-mediated inhibition of CD4+ T cell priming results in dominance of type 1 CD8+ T cells in the immune response to the contact sensitizer trinitrophenyl. *J. Immunol.* 173, 3178–3185.
- Martin, S.F., Esser, P.R., Weber, F.C., Jakob, T., Freudenberg, M.A., Schmidt, M., Goebeler, M., 2011. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 66, 1152–1163.
- Martin, S.F., Jakob, T., 2008. From innate to adaptive immune responses in contact hypersensitivity. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 8, 289–293.
- Martinon, F., 2010. Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur. J. Immunol.* 40, 616–619.
- Martinon, F., Mayor, A., Tschopp, J., 2009. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 229–265.
- Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., Koyasu, S., Matsumoto, K., Takeda, K., Ichijo, H., 2005. ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat. Immunol.* 6, 587–592.
- Maurer, M., Seidel-Guyenot, W., Metz, M., Knop, J., Steinbrink, K., 2003. Critical role of IL-10 in the induction of low zone tolerance to contact allergens. *J. Clin. Invest.* 112, 432–439.
- McLafferty, E., Hendry, C., Alistair, F., 2012. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nurs. Stand.* 27, 35–42.
- McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M., Hayes, J.D., 2004. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J. Biol. Chem.* 279, 31556–31567.
- Melrose, J., Tsurushita, N., Liu, G., Berg, E.L., 1998. IFN-gamma inhibits activation-induced expression of E- and P-selectin on endothelial cells. *J. Immunol.* 161, 2457–2464.
- Merad, M., Ginhoux, F., Collin, M., 2008. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 935–947.
- Merad, M., Manz, M.G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I., Weissman, I.L., Cyster, J.G., Engleman, E.G., 2002. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat. Immunol.* 3, 1135–1141.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., Mortha, A., 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 563–604.
- Mercado, N., Thimmulappa, R., Thomas, C.M.R., Fenwick, P.S., Chana, K.K., Donnelly, L.E., Biswal, S., Ito, K., Barnes, P.J., 2011. Decreased histone deacetylase 2 impairs Nrf2 activation by oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 406, 292–298.
- Migdal, C., Botton, J., El Ali, Z., Azoury, M.E., Guldemann, J., Gimenez-Arnau, E., Lepoittevin, J.P., Kerdine-Romer, S., Pallardy, M., 2013. Reactivity of chemical sensitizers toward amino acids in cellulo plays a role in the activation of the Nrf2-ARE pathway in human monocyte dendritic cells and the THP-1 cell line. *Toxicol Sci* 133, 259–274.

- Migdal, C., Foggia, L., Tailhardat, M., Courtellemont, P., Haftek, M., Serres, M., 2010. Sensitization effect of thimerosal is mediated in vitro via reactive oxygen species and calcium signaling. *Toxicology* 274, 1–9.
- Migdal, C., Serres, M., 2011. [Reactive oxygen species and oxidative stress]. *Med Sci* 27, 405–412.
- Milpied-Homs, B., Collet, E., Vigan, M., 2009. Allergic dermatitis. *Ann Dermatol Venerol* 136, 573.
- Minden, A., Lin, A., Smeal, T., Dérijard, B., Cobb, M., Davis, R., Karin, M., 1994. c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6683–6688.
- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., Kan, Y.W., 1994. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 9926–9930.
- Moniaga, C.S., Egawa, G., Kawasaki, H., Hara-Chikuma, M., Honda, T., Tanizaki, H., Nakajima, S., Otsuka, A., Matsuoka, H., Kubo, A., Sakabe, J., Tokura, Y., Miyachi, Y., Amagai, M., Kabashima, K., 2010. Flaky tail mouse denotes human atopic dermatitis in the steady state and by topical application with *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. *Am. J. Pathol.* 176, 2385–2393.
- Monney, L., Sabatos, C.A., Gaglia, J.L., Ryu, A., Waldner, H., Chernova, T., Manning, S., Greenfield, E.A., Coyle, A.J., Sobel, R.A., Freeman, G.J., Kuchroo, V.K., 2002. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 415, 536–541.
- Monzon, M.E., Fregien, N., Schmid, N., Falcon, N.S., Campos, M., Casalino-Matsuda, S.M., Forteza, R.M., 2010. Reactive oxygen species and hyaluronidase 2 regulate airway epithelial hyaluronan fragmentation. *J. Biol. Chem.* 285, 26126–26134.
- Mora, J.R., von Andrian, U.H., 2006. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends Immunol.*
- Morzadec, C., Macoch, M., Sparfel, L., Kerdine-Römer, S., Fardel, O., Vernhet, L., 2014. Nrf2 expression and activity in human T lymphocytes: stimulation by T cell receptor activation and priming by inorganic arsenic and tert-butylhydroquinone. *Free Radic. Biol. Med.* 71C, 133–145.
- Moser, M., Leo, O., 2010. Key concepts in immunology. *Vaccine* 28, C2–13.
- Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969.
- Mueller, D.L., Jenkins, M.K., Schwartz, R.H., 1989. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 445–480.
- Mueller, S.N., Gebhardt, T., Carbone, F.R., Heath, W.R., 2013. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 137–61.
- Munn, D.H., Mellor, A.L., 2007. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J. Clin. Invest.* 117, 1147–1154.
- Muto, J., Morioka, Y., Yamasaki, K., Kim, M., Garcia, A., Carlin, A.F., Varki, A., Gallo, R.L., 2014. Hyaluronan digestion controls DC migration from the skin. *J. Clin. Invest.* 124, 1309–1319.

N.

- Na, H.K., Surh, Y.J., 2006. Transcriptional regulation via cysteine thiol modification: A novel molecular strategy for chemoprevention and cytoprotection, in: *Molecular Carcinogenesis*. pp. 368–380.
- Na, K., Kim, K.-E., Park, S.-T., Kim, T.-Y., 2007. EC-SOD suppresses contact hypersensitivity in mouse skin by impairing Langerhans cell migration. *J. Invest. Dermatol.* 127, 1930–1937.
- Nace, G., Evankovich, J., Eid, R., Tsung, A., 2012. Dendritic cells and damage-associated molecular patterns: endogenous danger signals linking innate and adaptive immunity. *J. Innate Immun.* 4, 6–15.
- Naito, Y., Takagi, T., Higashimura, Y., 2014. Heme oxygenase-1 and anti-inflammatory M2 macrophages. *Arch. Biochem. Biophys.* 564C, 83–88.
- Nakae, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Sudo, K., Iwase, M., Homma, I., Sekikawa, K., Asano, M., Iwakura, Y., 2002. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 17, 375–387.
- Natsch, A., 2009. The Nrf2-Keap1-ARE toxicity pathway as a cellular sensor for skin sensitizers-Functional relevance and a hypothesis on innate reactions to skin sensitizers. *Toxicol. Sci.* 113, 284–292.
- Natsch, A., Emter, R., 2008. Skin sensitizers induce antioxidant response element dependent genes: application to the in vitro testing of the sensitization potential of chemicals. *Toxicol Sci* 102, 110–119.
- Neefjes, J., Jongstra, M.L.M., Paul, P., Bakke, O., 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 823–36.
- Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z., Nickoloff, B.J., 2009. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 679–691.
- Neves, B.M., Goncalo, M., Figueiredo, A., Duarte, C.B., Lopes, M.C., Cruz, M.T., 2011. Signal transduction profile of chemical sensitizers in dendritic cells: an endpoint to be included in a cell-based in vitro alternative approach to hazard identification? *Toxicol Appl Pharmacol* 250, 87–95.
- Newton, K., Dixit, V.M., 2012. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a006049.
- Nguyen, T., Sherratt, P.J., Nioi, P., Yang, C.S., Pickett, C.B., 2005. Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J. Biol. Chem.* 280, 32485–32492.
- Nielsen, M.M., Lovato, P., MacLeod, A.S., Witherden, D. a, Skov, L., Dyring-Andersen, B., Dabelsteen, S., Woetmann, A., Ødum, N., Havran, W.L., Geisler, C., Bonefeld, C.M., 2014. IL-1 β -dependent activation of dendritic epidermal T cells in contact hypersensitivity. *J. Immunol.* 192, 2975–2983.
- Nioi, P., Nguyen, T., 2007. A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. *Biochem Biophys Res Commun* 362, 816–821.
- Niture, S.K., Jain, A.K., Jaiswal, A.K., 2009. Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J. Cell Sci.* 122, 4452–4464.
- Niture, S.K., Jaiswal, A.K., 2011. Inhibitor of Nrf2 (INrf2 or Keap1) protein degrades Bcl-xL via phosphoglycerate mutase 5 and controls cellular apoptosis. *J. Biol. Chem.* 286, 44542–44556.

Niture, S.K., Jaiswal, A.K., 2011. INrf2 (Keap1) targets Bcl-2 degradation and controls cellular apoptosis. *Cell Death Differ.* 18, 439–451.

Niture, S.K., Jaiswal, A.K., 2009. Prothymosin- α mediates nuclear import of the INrf2/Cul3 Rbx1 complex to degrade nuclear Nrf2. *J. Biol. Chem.* 284, 13856–13868.

Niture, S.K., Khatri, R., Jaiswal, A.K., 2014. Regulation of Nrf2-an update. *Free Radic. Biol. Med.* 66, 36–44.

Novak, N., Baurecht, H., Schäfer, T., Rodriguez, E., Wagenpfeil, S., Klopp, N., Heinrich, J., Behrendt, H., Ring, J., Wichmann, E., Illig, T., Weidinger, S., 2008. Loss-of-function mutations in the filaggrin gene and allergic contact sensitization to nickel. *J. Invest. Dermatol.* 128, 1430–1435.

O.

O'Garra, A., Vieira, P., 2004. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat. Med.* 10, 801–805.

O'Leary, J.G., Goodarzi, M., Drayton, D.L., von Andrian, U.H., 2006. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat. Immunol.* 7, 507–516.

Oflazoglu, E., Swart, D.A., Anders-Bartholo, P., Jessup, H.K., Norment, A.M., Lawrence, W.A., Brasel, K., Tocker, J.E., Horan, T., Welcher, A.A., Fitzpatrick, D.R., 2004. Paradoxical role of programmed death-1 ligand 2 in Th2 immune responses in vitro and in a mouse asthma model in vivo. *Eur. J. Immunol.* 34, 3326–3336.

Onderdijk, a J., Balak, D.M.W., Baerveldt, E.M., Florencia, E.F., Kant, M., Laman, J.D., van Ijcken, W.F.J., Racz, E., de Ridder, D., Thio, H.B., Prens, E.P., 2014. Regulated genes in psoriasis skin during treatment with fumaric acid esters. *Br. J. Dermatol.* 732–741.

Ooi, A., Dykema, K., Ansari, A., Petillo, D., Snider, J., Kahnoski, R., Anema, J., Craig, D., Carpten, J., Teh, B.T., Furge, K. a., 2013. CUL3 and NRF2 mutations confer an NRF2 activation phenotype in a sporadic form of papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 73, 2044–2051.

Ouweland, K., Santegoets, S.J.A.M., Bruynzeel, D.P., Scheper, R.J., de Gruijl, T.D., Gibbs, S., 2008. CXCL12 is essential for migration of activated Langerhans cells from epidermis to dermis. *Eur. J. Immunol.* 38, 3050–3059.

Oyake, T., Itoh, K., Motohashi, H., Hayashi, N., Hoshino, H., Nishizawa, M., Yamamoto, M., Igarashi, K., 1996. Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6083–6095.

P.

Pae, H.-O., Ae Ha, Y., Chai, K.-Y., Chung, H.-T., 2008. Heme oxygenase-1 attenuates contact hypersensitivity induced by 2,4-dinitrofluorobenzene in mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 30, 207–216.

Pae, H.O., Oh, G.S., Choi, B.M., Chae, S.C., Chung, H.T., 2003. Differential expressions of heme oxygenase-1 gene in CD25- and CD25+ subsets of human CD4+ T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 701–705.

- Pae, H.-O., Oh, G.-S., Choi, B.-M., Chae, S.-C., Kim, Y.-M., Chung, K.-R., Chung, H.-T., 2004. Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J. Immunol.* 172, 4744–4751.
- Park, J.J., Omiya, R., Matsumura, Y., Sakoda, Y., Kuramasu, A., Augustine, M.M., Yao, S., Tsushima, F., Narazaki, H., Anand, S., Liu, Y., Strome, S.E., Chen, L., Tamada, K., 2010. B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance. *Blood* 116, 1291–1298.
- Park, J.S., Kim, H.S., 2014. Regulation of hemeoxygenase-1 gene expression by Nrf2 and c-Jun in tertiary butylhydroquinone-stimulated rat primary astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 447, 672–677.
- Pasparakis, M., Haase, I., Nestle, F.O., 2014. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 289–301.
- Paust, S., Gill, H.S., Wang, B.-Z., Flynn, M.P., Moseman, E.A., Senman, B., Szczepanik, M., Telenti, A., Askenase, P.W., Compans, R.W., von Andrian, U.H., 2010a. Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses. *Nat. Immunol.* 11, 1127–1135.
- Paust, S., Senman, B., Von Andrian, U.H., 2010b. Adaptive immune responses mediated by natural killer cells. *Immunol. Rev.* 235, 286–296.
- Peiser, M., Tralau, T., Heidler, J., Api, A.M., Arts, J.H., Basketter, D.A., English, J., Diepgen, T.L., Fuhlbrigge, R.C., Gaspari, A.A., Johansen, J.D., Karlberg, A.T., Kimber, I., Lepoittevin, J.P., Liebsch, M., Maibach, H.I., Martin, S.F., Merk, H.F., Platzeck, T., Rustemeyer, T., Schnuch, A., Vandebruel, R.J., White, I.R., Luch, A., 2011. Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. Current knowledge assembled at an international workshop at BfR, Germany. *Cell Mol Life Sci* 69, 763–781.
- Peng, H., Jiang, X., Chen, Y., Sojka, D.K., Wei, H., Gao, X., Sun, R., Yokoyama, W.M., Tian, Z., 2013. Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation. *J. Clin. Invest.* 123, 1444–1456.
- Pennino, D., Eyerich, K., Scarponi, C., Carbone, T., Eyerich, S., Nasorri, F., Garcovich, S., Traidl-Hoffmann, C., Albanesi, C., Cavani, A., 2010. IL-17 amplifies human contact hypersensitivity by licensing hapten nonspecific Th1 cells to kill autologous keratinocytes. *J. Immunol.* 184, 4880–4888.
- Phan, T.G., Gray, E.E., Cyster, J.G., 2009. The microanatomy of B cell activation. *Curr Opin Immunol* 21, 258–265.
- Pi, J., Bai, Y., Reece, J.M., Williams, J., Liu, D., Freeman, M.L., Fahl, W.E., Shugar, D., Liu, J., Qu, W., Collins, S., Waalkes, M.P., 2007. Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2. *Free Radic Biol Med* 42, 1797–1806.
- Pickard, C., Smith, A.M., Cooper, H., Strickland, I., Jackson, J., Healy, E., Friedmann, P.S., 2007. Investigation of mechanisms underlying the T-cell response to the hapten 2,4-dinitrochlorobenzene. *J. Invest. Dermatol.* 127, 630–637.
- Posadas, S.J., Pichler, W.J., 2007. Delayed drug hypersensitivity reactions - new concepts. *Clin. Exp. Allergy* 37, 989–999.
- Probst, H.C., Muth, S., Schild, H., 2014. Regulation of the tolerogenic function of steady-state DCs. *Eur. J. Immunol.* 44, 927–933.
- Proksch, E., Brandner, J.M., Jensen, J.M., 2008. The skin: An indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* 17, 1063–1072.

Proksch, E., Fölster-Holst, R., Jensen, J.M., 2006. Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *J. Dermatol. Sci.* 43, 159–169.

R.

Raghavan, B., Martin, S.F., Esser, P.R., Goebeler, M., Schmidt, M., 2012. Metal allergens nickel and cobalt facilitate TLR4 homodimerization independently of MD2. *EMBO Rep.* 13, 1109–15.

Ramos-Gomez, M., Kwak, M.K., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., Kensler, T.W., 2001. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in *nrf2* transcription factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3410–3415.

Ramsey, C.P., Glass, C.A., Montgomery, M.B., Lindl, K.A., Ritson, G.P., Chia, L.A., Hamilton, R.L., Chu, C.T., Jordan-Sciutto, K.L., 2007. Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases. *J. Neuropathol Exp Neurol* 66, 75–85.

Raninga, P. V., Trapani, G. Di, Tonissen, K.F., 2014. Cross talk between two antioxidant systems , Thioredoxin and DJ-1 : consequences for cancer 1, 95–110.

Ratzinger, G., Stoitzner, P., Ebner, S., Lutz, M.B., Layton, G.T., Rainer, C., Senior, R.M., Shipley, J.M., Fritsch, P., Schuler, G., Romani, N., 2002. Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. *J. Immunol.* 168, 4361–4371.

Reisman, S.A., Yeager, R.L., Yamamoto, M., Klaassen, C.D., 2009. Increased Nrf2 activation in livers from *keap1*-knockdown mice Increases expression of cytoprotective genes that detoxify electrophiles more than those that detoxify reactive oxygen species. *Toxicol. Sci.* 108, 35–47.

Reiter, R.J., Tan, D.X., Manchester, L.C., Qi, W., 2001. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 34, 237–256.

Reizis, B., 2010. Regulation of plasmacytoid dendritic cell development. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 206–211.

Ren, D., Villeneuve, N.F., Jiang, T., Wu, T., Lau, A., Toppin, H.A., Zhang, D.D., 2011. Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1433–1438.

Rengarajan, J., 2002. Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4) Interacts with NFATc2 to Modulate Interleukin 4 Gene Expression. *J. Exp. Med.* 195, 1003–1012.

Ring, S., Karakhanova, S., Johnson, T., Enk, A.H., Mahnke, K., 2010. Gap junctions between regulatory T cells and dendritic cells prevent sensitization of CD8(+) T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 237–246.e1–e7.

Ring, S., Oliver, S.J., Cronstein, B.N., Enk, A.H., Mahnke, K., 2009. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions through a CD39, adenosine-dependent mechanism. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 1287–1296.e2.

Ring, S., Schäfer, S.C., Mahnke, K., Lehr, H.-A., Enk, A.H., 2006. CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue. *Eur. J. Immunol.* 36, 2981–2992.

Rockwell, C.E., Zhang, M., Fields, P.E., Klaassen, C.D., 2012. Th2 skewing by activation of Nrf2 in CD4(+) T cells. *J. Immunol.* 188, 1630–7.

- Rodriguez, K.J., Wong, H.K., Oddos, T., Southall, M., Frei, B., Kaur, S., 2013. A purified Feverfew extract protects from oxidative damage by inducing DNA repair in skin cells via a PI3-kinase-dependent Nrf2/ARE pathway. *J. Dermatol. Sci.* 72, 304–310.
 - Romagnoli, P., Labhardt, A.M., Sinigaglia, F., 1991. Selective interaction of Ni with an MHC-bound peptide. *EMBO J.* 10, 1303–1306.
 - Rückert, R., Brandt, K., Hofmann, U., Bulfone-Paus, S., Paus, R., 2002. IL-2-IgG2b fusion protein suppresses murine contact hypersensitivity in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 119, 370–376.
 - Rushmore, T.H., Morton, M.R., Pickett, C.B., 1991. The antioxidant responsive element: Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J. Biol. Chem.* 266, 11632–11639.
 - Ryan, C.A., Gildea, L.A., Hulette, B.C., Dearman, R.J., Kimber, I., Gerberick, G.F., 2004. Gene expression changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. *Toxicol. Lett.* 150, 301–316.
- S.**
- Saei, A., Hadjati, J., 2013. Tolerogenic dendritic cells: Key regulators of peripheral tolerance in health and disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 161, 293–303.
 - Saint-Mezard, P., Krasteva, M., Chavagnac, C., Bosset, S., Akiba, H., Kehren, J., Kanitakis, J., Kaiserlian, D., Nicolas, J.F., Berard, F., 2003. Afferent and efferent phases of allergic contact dermatitis (ACD) can be induced after a single skin contact with haptens: Evidence using a mouse model of primary ACD. *J. Invest. Dermatol.* 120, 641–647.
 - Saint-Mezard, P., Rosieres, A., Krasteva, M., Berard, F., Dubois, B., Kaiserlian, D., Nicolas, J.F., 2004. Allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 14, 284–295.
 - Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., Nomura, T., 2006. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 212, 8–27.
 - Salazar, M., Rojo, A.I., Velasco, D., de Sagarra, R.M., Cuadrado, A., 2006. Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* 281, 14841–14851.
 - Salek-Ardakani, S., Song, J., Halteman, B.S., Jember, A.G.-H., Akiba, H., Yagita, H., Croft, M., 2003. OX40 (CD134) controls memory T helper 2 cells that drive lung inflammation. *J. Exp. Med.* 198, 315–324.
 - Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., Lanzavecchia, A., 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182, 389–400.
 - Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A., 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708–712.
 - Sangokoya, C., Telen, M.J., Chi, J.T., 2010. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. *Blood* 116, 4338–4348.

- Sankaranarayanan, K., Jaiswal, A.K., 2004. Nrf3 negatively regulates antioxidant-response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *J. Biol. Chem.* 279, 50810–50817.
- Santamaria, L., Perez Soler, M., Hauser, C., Blaser, K., 1995. Allergen specificity and endothelial transmigration of T cells in allergic contact dermatitis and atopic dermatitis are associated with the cutaneous lymphocyte antigen. *Int Arch Allergy Immunol.* 107, 359–62.
- Santamaria-Babí, L.F., 2004. CLA+ T cells in cutaneous diseases. *Eur. J. Dermatology* 14, 13–18.
- Saw, C.L., Huang, M.T., Liu, Y., Khor, T.O., Conney, A.H., Kong, A.N., 2011. Impact of Nrf2 on UVB-induced skin inflammation/photoprotection and photoprotective effect of sulforaphane. *Mol. Carcinog.* 50, 479–486.
- Saw, C.L.L., Yang, A.Y., Huang, M.-T., Liu, Y., Lee, J.H., Khor, T.O., Su, Z.-Y., Shu, L., Lu, Y., Conney, A.H., Kong, A.-N.T., 2014. Nrf2 null enhances UVB-induced skin inflammation and extracellular matrix damages. *Cell Biosci.* 4, 39.
- Scannevin, R.H., Chollate, S., Jung, M.Y., Shackett, M., Patel, H., Bista, P., Zeng, W., Ryan, S., Yamamoto, M., Lukashev, M., Rhodes, K.J., 2012. Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 341, 274–284.
- Schaefer, L., 2014. Complexity of danger: The diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J. Biol. Chem.* 289, 35237–35245.
- Schäfer, M., Dütsch, S., Auf Dem Keller, U., Navid, F., Schwarz, A., Johnson, D.A., Johnson, J.A., Werner, S., 2010. Nrf2 establishes a glutathione-mediated gradient of UVB cytoprotection in the epidermis. *Genes Dev.* 24, 1045–1058.
- Schmidt, M., Raghavan, B., Müller, V., Vogl, T., Fejer, G., Tchaptchet, S., Keck, S., Kalis, C., Nielsen, P.J., Galanos, C., Roth, J., Skerra, A., Martin, S.F., Freudenberg, M.A., Goebeler, M., 2010. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat. Immunol.* 11, 814–819.
- Seneschal, J., Clark, R.A., Gehad, A., Baecher-Allan, C.M., Kupper, T.S., 2012. Human Epidermal Langerhans Cells Maintain Immune Homeostasis in Skin by Activating Skin Resident Regulatory T Cells. *Immunity* 36, 873–884.
- Seo, W.Y., Goh, A.R., Ju, S.M., Song, H.Y., Kwon, D.J., Jun, J.G., Kim, B.C., Choi, S.Y., Park, J., 2011. Celastrol induces expression of heme oxygenase-1 through ROS/Nrf2/ARE signaling in the HaCaT cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407, 535–540.
- Shortman, K., Naik, S.H., 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 19–30.
- Shuford, W.W., Klussman, K., Tritchler, D.D., Loo, D.T., Chalupny, J., Siadak, A.W., Brown, T.J., Emswiler, J., Raecho, H., Larsen, C.P., Pearson, T.C., Ledbetter, J.A., Aruffo, A., Mittler, R.S., 1997. 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J. Exp. Med.* 186, 47–55.
- Sica, G.L., Choi, I.H., Zhu, G., Tamada, K., Wang, S.D., Tamura, H., Chapoval, A.I., Flies, D.B., Bajorath, J., Chen, L., 2003. B7-H4, a Molecule of the B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity. *Immunity* 18, 849–861.
- Sieben, S., Baron, J.M., Blömeke, B., Merk, H.F., 1999. Multiple cytochrome P450-isoenzymes mRNA are expressed in dendritic cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118, 358–361.

- Siegel, D., Yan, C., Ross, D., 2012. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in the sensitivity and resistance to antitumor quinones. *Biochem. Pharmacol.* 83, 1033–1040.
- Silberberg, I., Baer, R.L., Rosenthal, S.A., 1976. The role of Langerhans cells in allergic contact hypersensitivity. A review of findings in man and guinea pigs. *J. Invest. Dermatol.* 66, 210–217.
- Sixt, M., Kanazawa, N., Selg, M., Samson, T., Roos, G., Reinhardt, D.P., Pabst, R., Lutz, M.B., Sorokin, L., 2005. The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity* 22, 19–29.
- Smith, C.K., Moore, C.A., Elahi, E.N., Smart, A.T., Hotchkiss, S.A., 2000. Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde, and cinnamic alcohol. *Toxicol Appl Pharmacol* 168, 189–199.
- Sparber, F., 2014. Langerhans cells: an update. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 12, 1107–11.
- Staquet, M.J., Piccardi, N., Piccirilli, A., Vincent, C., Schmitt, D., Msika, P., 2004. Novel protein kinase C and matrix metalloproteinase inhibitors of vegetable origin as potential modulators of langerhans cell migration following hapten-induced sensitization. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 133, 348–356.
- Steinman, R., Nussenzweig, M., 2002. Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 351–8.
- Streilein, J.W., 1983. Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. *J. Invest. Dermatol.* 80 Suppl, 12s–16s.
- Suh, W.-K., Gajewska, B.U., Okada, H., Gronski, M.A., Bertram, E.M., Dawicki, W., Duncan, G.S., Bukczynski, J., Plyte, S., Elia, A., Wakeham, A., Itie, A., Chung, S., Da Costa, J., Arya, S., Horan, T., Campbell, P., Gaida, K., Ohashi, P.S., Watts, T.H., Yoshinaga, S.K., Bray, M.R., Jordana, M., Mak, T.W., 2003. The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nat. Immunol.* 4, 899–906.
- Sun, Z., Chin, Y.E., Zhang, D.D., 2009. Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response. *Mol. Cell. Biol.* 29, 2658–2672.
- Sun, Z., Huang, Z., Zhang, D.D., 2009. Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. *PLoS One* 4, e6588.
- Sun, Z., Wu, T., Zhao, F., Lau, A., Birch, C.M., Zhang, D.D., 2011. KPNA6 (Importin {alpha}7)-mediated nuclear import of Keap1 represses the Nrf2-dependent antioxidant response. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1800–1811.
- Sun, Z., Zhang, S., Chan, J.Y., Zhang, D.D., 2007. Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6334–6349.
- Szczepanik, M., Akahira-Azuma, M., Bryniarski, K., Tsuji, R.F., Kawikova, I., Ptak, W., Kiener, C., Campos, R.A., Askenase, P.W., 2003. B-1 B cells mediate required early T cell recruitment to elicit protein-induced delayed-type hypersensitivity. *J. Immunol.* 171, 6225–6235.

T.

- Taguchi, K., Motohashi, H., Yamamoto, M., 2011. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells* 16, 123–140.

- Takaya, K., Suzuki, T., Motohashi, H., Onodera, K., Satomi, S., Kensler, T.W., Yamamoto, M., 2012. Validation of the multiple sensor mechanism of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 817–827.
- Tamagawa-Mineoka, R., Katoh, N., Ueda, E., Takenaka, H., Kita, M., Kishimoto, S., 2007. The role of platelets in leukocyte recruitment in chronic contact hypersensitivity induced by repeated elicitation. *Am. J. Pathol.* 170, 2019–2029.
- Tang, A., Amagai, M., Granger, L.G., Stanley, J.R., Udey, M.C., 1993. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 361, 82–85.
- Tang, X., Wang, H., Fan, L., Wu, X., Xin, A., Ren, H., Wang, X.J., 2011. Luteolin inhibits Nrf2 leading to negative regulation of the Nrf2/ARE pathway and sensitization of human lung carcinoma A549 cells to therapeutic drugs. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 1599–1609.
- Tangye, S.G., Ma, C.S., Brink, R., Deenick, E.K., 2013. The good, the bad and the ugly - T cells in human health and disease. *Nat Rev Immunol* 13, 412–426.
- Tanii, H., Higashi, To., Demura, M., Saijoh, K., 2012. Repeated Exposure to Cruciferous Allyl Nitrile Protects against Chemically Induced Skin Inflammation in the Mouse. *Food Nutr. Sci.* 03, 1037–1042.
- Tanito, M., Agbaga, M.P., Anderson, R.E., 2007. Upregulation of thioredoxin system via Nrf2-antioxidant responsive element pathway in adaptive-retinal neuroprotection in vivo and in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 1838–1850.
- Tauber, A.I., 1994. The immune self: Theory or metaphor? *Immunol. Today* 15, 134–136.
- Tay, S.S., Roediger, B., Tong, P.L., Tikoo, S., Weninger, W., 2014. The Skin-Resident Immune Network. *Curr. Dermatol. Rep.* 3, 13–22.
- Theoharides, T.C., Alysandratos, K.D., Angelidou, A., Delivanis, D.A., Sismanopoulos, N., Zhang, B., Asadi, S., Vasiadi, M., Weng, Z., Miniati, A., Kalogeromitros, D., 2012. Mast cells and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1822, 21–33.
- Theoharides, T.C., Kalogeromitros, D., 2006. The critical role of mast cells in allergy and inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1088, 78–99.
- Thierse, H.J., Gamerding, K., Junkes, C., Guerreiro, N., Weltzien, H.U., 2005. T cell receptor (TCR) interaction with haptens: metal ions as non-classical haptens. *Toxicology* 209, 101–107.
- Thimmulappa, R.K., Lee, H., Rangasamy, T., Reddy, S.P., Yamamoto, M., Kensler, T.W., Biswal, S., 2006. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J Clin Invest* 116, 984–995.
- Thimmulappa, R.K., Mai, K.H., Srisuma, S., Kensler, T.W., Yamamoto, M., Biswal, S., 2002. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res.* 62, 5196–5203.
- Thyssen, J.P., Ross-Hansen, K., Menné, T., Johansen, J.D., 2010. Patch test reactivity to metal allergens following regulatory interventions: A 33-year retrospective study. *Contact Dermatitis* 63, 102–106.
- Tian, F., Zhang, F., Lai, X., Wang, L., Yang, L., Wang, X., Singh, G., Zhong, J.L., 2011. Nrf2-mediated protection against UVA radiation in human skin keratinocytes. *Biosci. Trends* 5, 23–29.

- Tivol, E.A., Borriello, F., Schweitzer, A.N., Lynch, W.P., Bluestone, J.A., Sharpe, A.H., 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3, 541–547.
- Tomura, M., Honda, T., Tanizaki, H., Otsuka, A., Egawa, G., Tokura, Y., Waldmann, H., Hori, S., Cyster, J.G., Watanabe, T., Miyachi, Y., Kanagawa, O., Kabashima, K., 2010. Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 883–893.
- Tong, K.I., Katoh, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T., Yamamoto, M., 2006. Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2887–2900.
- Tong, K.I., Kobayashi, A., Katsuoka, F., Yamamoto, M., 2006. Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: A hinge and latch mechanism, in: *Biological Chemistry*. pp. 1311–1320.
- Tong, K.I., Padmanabhan, B., Kobayashi, A., Shang, C., Hirotsu, Y., Yokoyama, S., Yamamoto, M., 2007. Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7511–7521.
- Tortora, G.J. and B.D., Derrickson, B., 2007. *Principles of Anatomy and Physiology*.
- Traidl, C., Sebastiani, S., Albanesi, C., Merk, H.F., Puddu, P., Girolomoni, G., Cavani, A., 2000. Disparate cytotoxic activity of nickel-specific CD8+ and CD4+ T cell subsets against keratinocytes. *J. Immunol.* 165, 3058–3064.
- Trompezinski, S., Migdal, C., Tailhardat, M., Le Varlet, B., Courtellemont, P., Haftek, M., Serres, M., 2008. Characterization of early events involved in human dendritic cell maturation induced by sensitizers: Cross talk between MAPK signalling pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 230, 397–406.
- Tsuji, R.F., Kawikova, I., Ramabhadran, R., Akahira-Azuma, M., Taub, D., Hugli, T.E., Gerard, C., Askenase, P.W., 2000. Early local generation of C5a initiates the elicitation of contact sensitivity by leading to early T cell recruitment. *J. Immunol.* 165, 1588–1598.
- Tsushima, F., Iwai, H., Otsuki, N., Abe, M., Hirose, S., Yamazaki, T., Akiba, H., Yagita, H., Takahashi, Y., Omura, K., Okumura, K., Azuma, M., 2003. Preferential contribution of B7-H1 to programmed death-1-mediated regulation of hapten-specific allergic inflammatory responses. *Eur. J. Immunol.* 33, 2773–2782.
- Turbica, I., Gallais, Y., Gueguen, C., Tharinger, H., Al Sabbagh, C., Gorges, R., Gary-Gouy, H., Kerdine-Romer, S., Pallardy, M., Mascarell, L., Gleizes, a., Chollet-Martin, S., 2015. Ectosomes from neutrophil-like cells down-regulate nickel-induced dendritic cell maturation and promote Th2 polarization. *J. Leukoc. Biol.* 97, 1–13.
- Turley, A.E., Zagorski, J.W., Rockwell, C.E., 2015. The Nrf2 activator tBHQ inhibits T cell activation of primary human CD4 T cells. *Cytokine* 71, 289–295.

U.

- Ulges, A., Klein, M., Reuter, S., Gerlitzki, B., Hoffmann, M., Grebe, N., Staudt, V., Stergiou, N., Bohn, T., Brühl, T.-J., Muth, S., Yurugi, H., Rajalingam, K., Bellinghausen, I., Tuettenberg, A., Hahn, S., Reißig, S., Haben, I., Zipp, F., Waisman, A., Probst, H.-C., Beilhack, A., Buchou, T., Filhol-Cochet, O., Boldyreff, B., Breloer, M., Jonuleit, H., Schild, H., Schmitt, E., Bopp, T., 2015. Protein kinase CK2 enables regulatory T cells to suppress excessive TH2 responses in vivo. *Nat. Immunol.* 16, 267–75.

Usatine, R.P., Riojas, M., 2010. Diagnosis and management of contact dermatitis. *Am. Fam. Physician* 82, 249–255.

V.

Valdor, R., Macian, F., 2013. Induction and stability of the anergic phenotype in T cells. *Semin. Immunol.* 25, 313–20

Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., Caux, C., Lebecque, S., Saeland, S., 2000. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12, 71–81.

Valladeau, J., Saeland, S., 2000. La Langerine et les granules de Birbeck des cellules de Langerhans. *Med. Sci.* 16, 979–980.

Van Beelen, A.J., Zelinkova, Z., Taanman-Kueter, E.W., Muller, F.J., Hommes, D.W., Zaat, S. a J., Kapsenberg, M.L., de Jong, E.C., 2007. Stimulation of the Intracellular Bacterial Sensor NOD2 Programs Dendritic Cells to Promote Interleukin-17 Production in Human Memory T Cells. *Immunity* 27, 660–669.

Van Den Broeke, L.T., Heffler, L.C., Tengvall Linder, M., Nilsson, J.L.G., Karlberg, A.T., Scheynius, A., 1999. Direct Ni²⁺ antigen formation on cultured human dendritic cells. *Immunology* 96, 578–585.

Velichkova, M., Hasson, T., 2005. Keap1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of Nrf2 into and out of the nucleus via a Crm1-dependent nuclear export mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 25, 4501–4513.

Venugopal, R., Jaiswal, A.K., 1998. Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* 17, 3145–3156.

Vocanson, M., Hennino, A., Chavagnac, C., Rozieres, A., Saint-Mezard, P., Akiba, H., Satoh, M., Kaiserlian, D., Nicolas, J.F., 2006. [Allergic contact dermatitis: how to re-induce tolerance?]. *Med Sci* 22, 158–163.

Vocanson, M., Hennino, A., Chavagnac, C., Rozières, A., Saint-Mezard, P., Akiba, H., Satoh, M., Kaiserlian, D., Nicolas, J.-F., 2006. Allergic contact dermatitis: how to re-induce tolerance? *Med. Sci. (Paris)*. 22, 158–163.

Vocanson, M., Hennino, A., Rozieres, A., Poyet, G., Nicolas, J.F., 2009. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy* 64, 1699–1714.

Vocanson, M., Rozieres, A., Hennino, A., Poyet, G., Gaillard, V., Renaudineau, S., Achachi, A., Benetiere, J., Kaiserlian, D., Dubois, B., Nicolas, J.F., 2010. Inducible costimulator (ICOS) is a marker for highly suppressive antigen-specific T cells sharing features of TH17/TH1 and regulatory T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126, 280–9.

Vogt, A., Combadiere, B., Hadam, S., Stieler, K.M., Lademann, J., Schaefer, H., Autran, B., Sterry, W., Blume-Peytavi, U., 2006. 40 nm, but not 750 or 1,500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a⁺ cells after transcutaneous application on human skin. *J. Invest. Dermatol.* 126, 1316–1322.

Volonte, D., Liu, Z., Musille, P.M., Stoppani, E., Wakabayashi, N., Di, Y.-P., Lisanti, M.P., Kensler, T.W., Galbiati, F., 2013. Inhibition of nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2) by caveolin-1 promotes stress-induced premature senescence. *Mol. Biol. Cell* 24, 1852–62.

W.

- Wakabayashi, T., Hu, D.L., Tagawa, Y.I., Sekikawa, K., Iwakura, Y., Hanada, K., Nakane, A., 2005. IFN- γ and TNF- α are involved in urushiol-induced contact hypersensitivity in mice. *Immunol. Cell Biol.* 83, 18–24.
- Walzer, T., Marçais, A., Saltel, F., Bella, C., Jurdic, P., Marvel, J., 2003. Cutting edge: immediate RANTES secretion by resting memory CD8 T cells following antigenic stimulation. *J. Immunol.* 170, 1615–1619.
- Wang, L., Bursch, L.S., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Jameson, S.C., Hogquist, K.A., 2008. Langerin expressing cells promote skin immune responses under defined conditions. *J. Immunol.* 180, 4722–4727.
- Wang, X.J., Hayes, J.D., Henderson, C.J., Wolf, C.R., 2007. Identification of retinoic acid as an inhibitor of transcription factor Nrf2 through activation of retinoic acid receptor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 19589–19594.
- Wang, X.J., Sun, Z., Villeneuve, N.F., Zhang, S., Zhao, F., Li, Y., Chen, W., Yi, X., Zheng, W., Wondrak, G.T., Wong, P.K., Zhang, D.D., 2008. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* 29, 1235–1243.
- Wang, X.-N., McGovern, N., Gunawan, M., Richardson, C., Windebank, M., Siah, T.-W., Lim, H.-Y., Fink, K., Li, J.L.Y., Ng, L.G., Ginhoux, F., Angeli, V., Collin, M., Haniffa, M., 2014. A three-dimensional atlas of human dermal leukocytes, lymphatics, and blood vessels. *J. Invest. Dermatol.* 134, 965–74.
- Wang, Y., Szretter, K.J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A.D., Diamond, M.S., Colonna, M., 2012. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat. Immunol.* 13, 753–760.
- Watai, Y., Kobayashi, A., Nagase, H., Mizukami, M., McEvoy, J., Singer, J.D., Itoh, K., Yamamoto, M., 2007. Subcellular localization and cytoplasmic complex status of endogenous Keap1. *Genes Cells* 12, 1163–1178.
- Watanabe, H., Gaide, O., Pétrilli, V., Martinon, F., Contassot, E., Roques, S., Kummer, J.A., Tschopp, J., French, L.E., 2007. Activation of the IL-1 β -processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 127, 1956–1963.
- Watanabe, N., Gavrieli, M., Sedy, J.R., Yang, J., Fallarino, F., Loftin, S.K., Hurchla, M.A., Zimmerman, N., Sim, J., Zang, X., Murphy, T.L., Russell, J.H., Allison, J.P., Murphy, K.M., 2003. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat. Immunol.* 4, 670–679.
- Watanabe, R., Fujimoto, M., Ishiura, N., Kuwano, Y., Nakashima, H., Yazawa, N., Okochi, H., Sato, S., Tedder, T.F., Tamaki, K., 2007. CD19 expression in B cells is important for suppression of contact hypersensitivity. *Am. J. Pathol.* 171, 560–570.
- Weber, F.C., Esser, P.R., Müller, T., Ganesan, J., Pellegatti, P., Simon, M.M., Zeiser, R., Idzko, M., Jakob, T., Martin, S.F., 2010. Lack of the purinergic receptor P2X(7) results in resistance to contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 207, 2609–2619.
- Weber, F.C., Nemeth, T., Csepregi, J.Z., Dudeck, a., Roers, a., Ozsvári, B., Oswald, E., Puskas, L.G., Jakob, T., Mocsai, a., Martin, S.F., 2014. Neutrophils are required for both the sensitization and elicitation phase of contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 212, 15–22.
- Weber, M., Hauschild, R., Schwarz, J., Moussion, C., de Vries, I., Legler, D.F., Luther, S. a, Bollenbach, T., Sixt, M., 2013. Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients. *Science* 339, 328–32.

Williams, M.A., Rangasamy, T., Bauer, S.M., Killedar, S., Karp, M., Kensler, T.W., Yamamoto, M., Breyse, P., Biswal, S., Georas, S.N., 2008. Disruption of the transcription factor Nrf2 promotes pro-oxidative dendritic cells that stimulate Th2-like immunoresponsiveness upon activation by ambient particulate matter. *J. Immunol.* 181, 4545–4559.

X.

Xu, B.H., Dilulio, N.A., Fairchild, K.L., 1996. T Cell Populations Primed by Hapten Sensitization in Contact Sensitivity Are Distinguished by Polarized Patterns of Cytokine Production: Interferon γ -producing (Tcl) Effector CD8 + T Cells and Interleukin (11) 4/II-10-producing (Th2) Negative Regulatory. *J. Exp. Med.* 183, 1001–12.

Y.

Yamamoto, T., Suzuki, T., Kobayashi, A., Wakabayashi, J., Maher, J., Motohashi, H., Yamamoto, M., 2008. Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. *Mol. Cell. Biol.* 28, 2758–2770.

Yang, M., Yao, Y., Eades, G., Zhang, Y., Zhou, Q., 2011. MiR-28 regulates Nrf2 expression through a Keap1-independent mechanism. *Breast Cancer Res. Treat.* 129, 983–991.

Yeang, H.X.A., Hamdam, J.M., Al-Huseini, L.M.A., Sethu, S., Djouhri, L., Walsh, J., Kitteringham, N., Park, B.K., Goldring, C.E., Sathish, J.G., 2012. Loss of transcription factor nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related factor-2 (Nrf2) leads to dysregulation of immune functions, redox homeostasis, and intracellular signaling in dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 287, 10556–10564.

Yoshida, Y., Yoshimi, R., Yoshii, H., Kim, D., Dey, A., Xiong, H., Munasinghe, J., Yazawa, I., O'Donovan, M.J., Maximova, O.A., Sharma, S., Zhu, J., Wang, H., Morse, H.C., Ozato, K., 2014. The Transcription Factor IRF8 Activates Integrin-Mediated TGF- β Signaling and Promotes Neuroinflammation. *Immunity* 40, 187–198.

Yu, M., Li, H., Liu, Q., Liu, F., Tang, L., Li, C., Yuan, Y., Zhan, Y., Xu, W., Li, W., Chen, H., Ge, C., Wang, J., Yang, X., 2011. Nuclear factor p65 interacts with Keap1 to repress the Nrf2-ARE pathway. *Cell Signal* 23, 883–892.

Yu, R., Chen, C., Mo, Y.Y., Hebbar, V., Owuor, E.D., Tan, T.H., Kong, A.N., 2000. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. *J Biol Chem* 275, 39907–39913.

Yu, R., Lei, W., Mandlekar, S., Weber, M.J., Der, C.J., Wu, J., Kong, A.N., 1999. Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals. *J Biol Chem* 274, 27545–27552.

Yu, R., Mandlekar, S., Lei, W., Fahl, W.E., Tan, T.H., Kong, A.N.T., 2000. p38 Mitogen-activated protein kinase negatively regulates the induction of phase II drug-metabolizing enzymes that detoxify carcinogens. *J. Biol. Chem.* 275, 2322–2327.

Z.

- Zelko, I.N., Mariani, T.J., Folz, R.J., 2002. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 337–349.
- Zhang, D.D., Hannink, M., 2003. Distinct Cysteine Residues in Keap1 Are Required for Keap1-Dependent Ubiquitination of Nrf2 and for Stabilization of Nrf2 by Chemopreventive Agents and Oxidative Stress. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8137–8151.
- Zhang, D.D., Lo, S.-C., Cross, J. V, Templeton, D.J., Hannink, M., 2004. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10941–10953.
- Zhang, D.D., Lo, S.C., Sun, Z., Habib, G.M., Lieberman, M.W., Hannink, M., 2005. Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 30091–30099.
- Zhang, H. ping, Zheng, F. li, Zhao, J. hui, Guo, D. xing, Chen, X. long, 2013. Genistein Inhibits ox-LDL-induced VCAM-1, ICAM-1 and MCP-1 Expression of HUVECs Through Heme Oxygenase-1. *Arch. Med. Res.* 44, 13–20.
- Zhang, Y., Crouch, D.H., Yamamoto, M., Hayes, J.D., 2006. Negative regulation of the Nrf1 transcription factor by its N-terminal domain is independent of Keap1: Nrf1, but not Nrf2, is targeted to the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 399, 373–385.
- Zhao, C., Gillette, D.D., Li, X., Zhang, Z., Wen, H., 2014. Nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2) is required for NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. *J. Biol. Chem.* 289, 17020–17029.
- Zhu, M., Zhang, Y., Cooper, S., Sikorski, E., Rohwer, J., Bowden, G.T., 2004. Phase II enzyme inducer, sulforaphane, inhibits UVB-induced AP-1 activation in human keratinocytes by a novel mechanism. *Mol. Carcinog.* 41, 179–186.

ANNEXE 1 : COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Communications orales

- 25th ERGECD (European Research Group on Experimental Contact Dermatitis), Paris, Juin 2014
« Protein Kinase CK2: a novel pathway involved in Dendritic Cells activation in response to Dinitrochlorobenzene »
- SPTC (Société de Pharmaco-toxicologie cellulaire), Rennes, France, Octobre 2014
« Protein Kinase CK2: a novel pathway involved in Dendritic Cells activation in response to Dinitrochlorobenzene »
- XIV^{èmes} Journées de l'école doctorale, ED425, Châtenay-Malabry, France, Juin 2014
« Protein Kinase CK2 controls Dendritic Cells activation in response to contact sensitizers like Dinitrochlorobenzene »

Posters

• International

- de Bourayne M., El Ali Z., Filhol O., Cochet C., Pallardy M., Kerdine-Römer S.
"Protein kinase CK2 and JNK control Nrf2/Keap1 activation in response to skin contact sensitizers in THP1 cells."
Biochemical Society, The Keap1/Nrf2 pathway in Health and Disease, Cambridge, UK (January 2015)
- de Bourayne M., El Ali Z., Filhol O., Cochet C., Pallardy M., Kerdine-Römer S.
"Protein kinase CK2 and JNK control Nrf2/Keap1 activation in response to skin contact sensitizers in THP1 cells."
SOT (Society of Toxicology), 53th annual meeting, Phoenix, USA (March, 2014)
- de Bourayne M., El Ali Z., Filhol O., Cochet C., Pallardy M., Kerdine-Römer S.
Protein kinase CK2 and JNK control Nrf2 accumulation in response to skin contact sensitizers in THP1 cells.
Eurotox, International Congress, Interlaken, 49th annual meeting, Switzerland (September, 2013)
- de Bourayne M., El Ali Z., Filhol O., Cochet C., Pallardy M., Kerdine-Römer S.
Protein kinase CK2 and JNK control Nrf2 accumulation in response to skin contact sensitizers in THP1 cells.
ULLA summer school, London, UK (July, 2013)

- **National**

- de Bourayne M., El Ali Z., Gallais Y., Rousseau P., Filhol O., Cochet C., Pallardy M., Kerdine-Römer S.
La protéine kinase CK2: une nouvelle kinase cruciale dans l'activation de la cellule dendritique en réponse à des signaux de danger.
SPTC (Société de Pharmaco-toxicologie cellulaire), Rennes, France (October 2014)
- de Bourayne M., El Ali Z., Filhol O., Cochet C., Pallardy M., Kerdine-Römer S
La protéine kinase CK2 contrôle l'accumulation du facteur de transcription Nrf2 en réponse aux molécules allergisantes dans les cellules THP1.
XIII^{èmes} Journées de l'école doctorale, ED425, Châtenay-Malabry, Paris, France (June, 2013)
- de Bourayne M., El Ali Z., Filhol O., Cochet C., Pallardy M., Kerdine-Römer S
La protéine kinase CK2 contrôle l'accumulation du facteur de transcription Nrf2 en réponse aux molécules allergisantes dans les cellules THP1.
SPTC (Société de Pharmaco-toxicologie cellulaire), Paris, France (June, 2013)
- de Bourayne M., El Ali Z., Filhol O., Cochet C., Pallardy M., Kerdine-Römer S
Protein kinase CK2 and c-Jun N-terminal kinase control Nrf2 accumulation in dendritic cells like THP1 in response to contact sensitizers.
CFCD (Club Francophone des Cellules Dendritiques), Paris, France (December, 2012)
- de Bourayne M., El Ali Z., Pallardy M., Kerdine-Römer S
L'activation du facteur de transcription Nrf2, régulateur rédox, est contrôlée par la kinase c-Jun-N-terminal et la caséine kinase II.
XII^{èmes} Journées de l'école doctorale, ED425, Châtenay-Malabry, Paris, France (June, 2012)
- de Bourayne M., El Ali Z., Pallardy M., Kerdine-Römer S
L'activation du facteur de transcription Nrf2, régulateur rédox, est contrôlée par la kinase c-Jun-N-terminal et la caséine kinase II.
SPTC (Société de Pharmaco-toxicologie cellulaire), Paris, France (May, 2012)

ANNEXE 2 : ARTICLE PUBLIÉ DANS ENCYCLOPEDIA OF INFLAMMATORY DISEASES

Dendritic cells

Zeina El Ali*, Romain Génard[£], Marie de Bourayne[£], Marc Pallardy[£] and Saadia Kerdine-Römer[£]

[£]INSERM, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry – France

UniverSud, INSERM UMR-996 ", Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France

*Current address : Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB), Faculté de Médecine, Université Paris-Est, Créteil – France

UPEC, IMRB, INSERM UMR-955, Team 12, Créteil, France

SYNONYMS

DC, antigen presenting cells (APC), langerhans cells (LC), dermal DC (dDC), conventionnal DC (cDC), plasmacytoid DC (pDC), slanDC, Tip-DC

DEFINITION

Dendritic cells (DC) are professional antigen presenting cells (APC) having the capacity to capture, process, migrate to lymph nodes (LN) and to present peptides *via* the major histocompatibility complex (MHC) molecules to T lymphocytes. DC are known to play a crucial role in the immune system by linking innate to adaptive immunity(Steinman, 2012).

The first population of DC has been discovered by Paul Langerhans, hence their name "Langerhans cells" in 1868. Since, Ralph Steinmann and Zanvil Cohn assigned the term DC in 1973. Since this discovery, researches have been focused on studying the different subsets of DC found until today.

At steady-state, DC, so-called in an immature state, participate in maintaining immunological self tolerance and homeostasis. In response to a stress or in inflammatory conditions, DC mature into inflammatory DC at the sites of inflammation leading to a sustained activation of the adaptive immune system (Chu et al., 2011).

STRUCTURE AND FUNCTIONS

DC are bone marrow derived cells expressing constitutively hematopoietic markers (CD45), low levels of Fc receptors but high levels of MHC class II (MHC-II), adhesion molecules (CD54, CD58, CD11c) and integrin (β 1 integrin). DC lack of T cell (CD3), B cell (CD19), monocyte (CD14), natural killer cell (CD56), granulocyte (CD66b) and erythrocyte lineage markers. DC also express co-stimulatory molecules including CD86, CD80, CD83 which are upregulated during DC maturation (Merad et al., 2013; Schraml and Reis, 2014; Steinman, 1991).

DC can be found in the skin, liver, spleen as well as in mucosal surfaces such as the lung and the intestine. DC patrol through the blood, peripheral tissues, lymph and secondary lymphoid organs (Merad et al., 2013; Toebak et al., 2009).

DC represent a heterogeneous cell population residing in most organs and acting usually as sentinels able to detect 'danger signals'. The theory of 'danger signals' proposed in 1994 by Matzinger suggests that "the immune system responds to substances that can cause damage, rather than to those that are simply foreign"(Matzinger, 1994). They include exogenous or endogenous molecules, or molecular structures, released or produced by cells generating stress or leading to cell death. These danger signals are perceived by DC, which become activated leading to an immune response. Cellular stress, heat shock proteins (HSP), necrotic cell death, interferon- α , interleukin-1 β , uric acid, high-mobility-group box 1 (HMGB1) and haptens have been suggested as danger signals(Pradeu and Cooper, 2012). Haptens are low molecular weight compounds (< 500 Da) having electrophilic properties and able to bind covalently to nucleophilic residues from cutaneous proteins leading to the formation of a hapten-carrier complex with immunogenic properties (Christensen and Haase, 2012). All these danger signals participate to the activation and the maturation of DC leading to their migration to LN and the induction of a primary immune response (Banchereau and Steinman, 1998; Gros and Novak, 2012).

Ontogeny and nomenclature of human and murine DC

DC arise from a common hematopoietic stem cell precursor. A bipotent progenitor in the bone marrow (BM), called macrophage and DC precursor (MDP), gives rise to DC and monocytes. MDP further differentiate into common DC precursors (CDP) to generate

plasmacytoid DC (pDC), conventional DC (cDC) and monocyte-derived DC (MoDC) (Malissen et al., 2014). cDC develop from the CDP through a pre-pDC and pre-cDC intermediate in the BM before migrating through the blood to lymphoid and non-lymphoid tissues. Similar to the CDP, a common monocyte progenitor (cMoP), downstream of MDP, gives rise to monocytes. Recently, Guilliams *et al.*, suggested dividing cDC into two main lineages: 'classical type 1 DC' (cDC1) for CD8 α ⁺ and CD103⁺ DC and 'classical type 2 DC' (cDC2) for CD11b⁺ DC and CD172a⁺ DC, on the basis of their distinct developmental pathways (Guilliams et al., 2014)(figure 1). In most tissues, cDC2 lack expression of CD103.

In the intestine, CD103⁺cDC are enriched in the Peyer's patches and mesenteric LN, and coexpress the cell surface marker CD8. CD103⁺cDC also express low levels of MHC-II and represent lymphoid tissue-resident CD8⁺cDC. In contrast, most lamina propria CD103⁺cDC express CD11b (Merad et al., 2013; Scott et al., 2014).

Skin dendritic cells

Langerhans cells

Langerhans cells (LC), first described by Paul Langerhans in 1868, are the main DC population present in the epidermis of healthy and non-inflamed skin. LC comprise about 3-5 % of all epidermal cells. Transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1), interleukin (IL)-34 through the colony-stimulating factor (CSF)-1 receptor are essential for the development and function of LC in mice and human. TGF- β , produced by both keratinocytes and LC themselves, maintains LC homeostasis (Tay et al., 2014).

LC are radioresistant and display a low-grade proliferation at the steady state (Scott et al., 2014). LC self-renew *in situ* throughout life independently from the BM and derive mostly from precursors that reside in the skin prior to birth (Merad et al., 2013). LC through self-renewal could contribute to LC steady-state homeostasis. It is well known now that LC derive from yolk sac progenitors and fetal liver monocytes (Hoeffel et al., 2012). In inflammatory conditions, with a LC depletion and a damage to the skin, LC rise from blood-borne monocytes (Merad et al., 2013). LC have a very long lifespan (Sparber, 2014).

LC are characterized phenotypically by lower MHC-II levels, intermediate CD11c levels, and very high levels of the C-type lectin langerin (CD207) and the dendritic cell

immunoreceptor (DCIR). Langerin is involved in the formation of the intracytoplasmic Birbeck granules, the hallmark organelle of LC. Furthermore, LC are known to express TLR1, 2, 3, 6, and 10 (Sparber, 2014).

The classical LC paradigm states that LC are maintained in an immature state in quiescent skin. In response to pathogens, LC capture antigens (Ag) and become mature. During the maturation process, LC up-regulate MHC-I and MHC-II molecules, co-stimulatory molecules like CD40, CD80 and CD86, and chemokine receptors such as CCR7. In parallel, a down-regulation of E-cadherin is observed allowing LC to migrate from the skin to draining LN. In LN, DC present Ag to T cells (Chu et al., 2011).

Several recent studies have shown the immunosuppressive functions of LC and their capacity to dampen T cell responses induced by dermal DC. For example, in the absence of LC, contact hypersensitivity in response to the epicutaneous application of low doses of haptens is increased (Bobr et al., 2010). Depending on the nature of the danger signal produced LC, due to their plasticity, can become tolerogenic or immunogenic (Malissen et al., 2014).

Dermal DC

Dermal DC (DDC) represent the major DC population that reside in the dermis. DDC are heterogenous population that derive from bone marrow progenitors and differentiate in the presence of FMS-like tyrosine kinase 3 (Flt3) ligand. In contrast to LC, DDC do not contain Birbeck granules. DDC proliferate constitutively *in situ* in murine and human quiescent dermis. They are characterized by the expression of the blood dendritic cell antigen (BDCA)-1/CD1c, CD11c, CD1b, CD36, CD205, MHC-II. Two populations of DDC have been identified: Langerin⁺ DDC also known as CD103⁺ DDC in mice or CD141^{high} in human and DDC langerin⁻ also known as CD11b⁺ in mice or CD14⁻/CD1a⁺ in human. Dermal CD14⁺ DC express a large number of C-type lectins including Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN), DEC-205, lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1), CLEC-6, Dectin-1 and DCIR. CD103⁺Langerin⁺ DDC or CD14⁺ DC are known to cross-present Ag to naïve CD8⁺ T cells *via* MHC-I molecules. The phenomenon of cross-presentation refers to the ability to process non-replicating Ag for presentation to T cells by MHC-I molecules. Furthermore, dermal CD14⁺ DC express Toll-like receptors (TLR) recognizing bacterial pathogen-associated molecular patterns (PAMP), such as TLR2, 4, 5, 6, 8, and 10. Recently, it has

been identified a CD141^{high} (BDCA-3) DC population in the human dermis that shows functional homology with murine CD103⁺ DDC (Haniffa et al., 2012).

Inflammatory skin DC

Inflammatory DC refer to a population of DC that are transiently recruited to inflammation sites in response to microbial, danger or inflammatory stimuli and disappear once the inflammation is resolved (Merad et al., 2013). They comprise several populations: inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC), tumor necrosis factor (TNF)- α and inducible oxide synthetase (iNOS)-producing (TIP)-DC, 6-sulfo LacNAc-expressing (slan) DC and plasmacytoid DC (pDC).

IDEC can be found in the epidermis whereas TIP-DC and slanDC can be found in the dermis of inflamed skin.

◆Inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC)

Inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC) are myeloid epidermal DC population that can be found in the lesional skin of patients with atopic dermatitis (AD), allergic contact dermatitis (ACD) or psoriasis. These cells are absent in the epidermis of healthy skin and can be observed in response to an inflammatory stimulus. Peripheral blood monocytes as well as dermal DC are regarded as potential precursor cells of IDEC (Gros and Novak, 2012).

IDEC lack Birbeck granules and Langerin expression, but show expression of the mannose receptor CD206, MHC-II, CD1a, CD1b, CD11c, CD11b, CD36, CD23, DC-SIGN and the low affinity receptor for IgE (Fc ϵ II/CD23) expressing cells. In lesional skin of patients with AD, IDEC show expression of the high-affinity receptor for IgE (Fc ϵ RI) and CD36 (Gros and Novak, 2012; Haniffa et al., 2014).

◆TNF- α and inducible oxide synthetase (iNOS)-producing (Tip)-DC

TNF- α and inducible oxide synthetase (iNOS)-producing (Tip)-DC are a subtype of myeloid DC that are increased in the dermis of psoriatic skin compared with normal skin. These DC produce TNF α and iNOS. Tip-DC were first described in the spleen during a murine model of *Listeria monocytogenes* infection and have also been found in murine *Escherichia coli*, *Brucella melitensis* and influenza infection. They have also been located

in the lamina propria of the human gut as well as in the skin treated topically with imiquimod (Aldara®), a TLR7/8 agonist, used in the treatment of human basal cell carcinoma and genital warts. Tip-DC are characterized by the expression of CD11c, CD86, and CD40 while they lack CD1a, CD1c or CD207 (Langerin) (Bangert et al., 2011; Chu et al., 2011; Wilsmann-Theis et al., 2013).

◆6-sulfo LacNAc-expressing (slan) DC

6-sulfo LacNAc-expressing (slan) DC represent 0.6–2% of peripheral blood mononuclear cell. They are the main myeloid DC population in human blood and are considered as the precursor of inflammatory dermal DC. SlanDC, from 6-sulfoLacNAc, an O-linked carbohydrate modification of P-selectin glycoprotein ligand-1, were described in lesional psoriatic skin as a new population of dermal DC. SlanDC are defined as: 6-sulfoLacNAc⁺, CD1c⁺, CD11c⁺, CD16⁺, CD14⁺, C5aR⁺, CD45RA⁺ (Gunther et al., 2012).

They are known to have the capacity to produce high amounts of IL-12 and TNF- α upon *in vitro* stimulation with lipopolysaccharide (LPS), a TLR4 ligand, (LPS). SlanDC detected in the dermis of psoriatic skin produce *in situ* TNF- α , iNOS and IL-23 (Gunther et al., 2012).

◆Plasmacytoid DC

Plasmacytoid DC (pDC) represent a minor population of DC found in peripheral blood and are located in both primary and secondary lymphoid organs including thymus, bone marrow, spleen, LN and tonsil. They can also be found in liver. They represent 0.2-0.8% of mononuclear blood cells (Merad et al., 2013).

At steady state, pDC are absent in healthy skin but are recruited during inflammation. Thus, pDC can infiltrate the dermis of inflamed skin under several pathogenic conditions, such as psoriasis, systemic lupus erythematosus (SLE) and certain skin tumors (Chu et al., 2011).

pDC constitutively express MHC-II. Murine pDC lack CD11b and express low levels of the integrin CD11c and the lineage markers CD45RA (B220⁺) and Ly6C (GR-1⁺). Human pDC express very low levels of CD11c. They express BDCA-2, BDCA-4, CD4, CD45RA Ag, DEC-205 and high levels of the IL-3 receptor (CD123).

pDC play a major role in anti-viral immunity. They recognize viral components through TLR7 and TLR9 that, respectively, recognize single-stranded RNA and DNA derived from

pathogens. Upon viral infection, pDC produce large amounts of type I interferons (IFN) (IFN- α and IFN- β).

Blood DC

Blood DC have been mostly studied in humans where both DC, pDC and slanDC can be found. Mouse blood DC are less well characterized. Human DC lack lineage (Lin) markers: CD3, CD19, CD14, CD20, CD56 and glycophorin A and constitutively express MHC-II. The majority of circulating DC expressing MHC-II⁺CD11c⁺ are pDC. Low numbers of DC expressing MHC-II⁺CD11c⁺ and MHC-II⁻CD11c⁺ giving rise to CD8 α ⁺ and CD8 α ⁻ DC in lymphoid organs respectively, have also been detected. Two human DC subpopulations expressing CD1c (BDCA-1) or CD141 (BDCA-3) have also been found in the blood (Merad et al., 2013).

Tolerogenic DC

The cellular microenvironment plays a crucial role in the generation of tolerogenic DC such as the presence of anti-inflammatory cytokines like TGF- β or IL-10. Tolerogenic DC express co-stimulatory molecules but are unable to produce pro-inflammatory cytokines (Saei and Hadjati, 2013). They induce immune tolerance by the induction of regulatory T cells. However, pro-inflammatory cytokines, such as IFN γ or TNF- α , can induce the expression of indoleamine 2, 3 dioxygenase (IDO) in DC, which inhibits T cells proliferation and their activation at the inflammation site. IDO is an intracellular enzyme that degrades the essential amino acid tryptophan, leading to the production of pro-apoptotic metabolites (kynurenines) (Coquerelle and Moser, 2010).

DC in lymphoid tissues

Lymphoid tissue-resident DC are mostly studied in mice, and little is known about their human counterparts.

In mice, **splenic DC** constitutively express MHC-II and CD11c. They include two major subsets: CD8 α ⁺CD4⁻CD11b⁻ DC localized mostly in the T-cell zone and CD4⁺CD8 α ⁻CD11b⁺ DC localized mostly in the marginal zone. A double-negative splenic DC has also been identified known as CD4⁻CD8 α ⁻CD11b⁺ DC. CD8 α ⁺CD4⁻CD11b⁻ DC known as CD8 α ⁺ are characterized in MHC-I presentation whereas CD4⁺CD8 α ⁻CD11b⁺

DC known as CD4⁺ DC subset are characterized in MHC-II presentation. CD8α⁺ DC can cross-present Ag unlike CD4⁺ DC (Merad et al., 2013).

LN DC are more heterogeneous as they include blood-derived lymphoid tissue-resident CD4⁺, CD8α⁺, double-negative spleen equivalent DC and migratory DC found in draining LN. For example, migratory epidermal LC and DDC are present in skin-draining LN but are absent in mesenteric LN (Merad et al., 2013).

Thymic DC are localized in the medulla. The majority of mouse thymic DC are CD8α⁺ and derive locally from early thymocyte progenitors. A minority of DC is CD8α⁻ and is characterized by the expression of signal regulatory protein (SRP)-α. Thymic DC play a major role in negative selection of T cells. Most human thymic DC are CD11c⁺CD11b⁻CD45RO^{low} and lack myeloid markers like human CD141⁺ DC and mouse CD8⁺ DC. In contrast, a minority of thymic DC are CD11c^{hi}CD11b⁺CD45RO^{hi} and express myeloid markers, like mouse CD11b⁺CD172a⁺ thymic DC (Merad et al., 2013).

Follicular DC (FDC) are a unique population of cells having an essential role in the formation of an efficient germinal center (GC) and in the production of high-affinity antibodies. They are located in B cell follicles in secondary lymphoid organs and in the light zones of GC. FDC derive from perivascular precursors of stromal cell origin. Their maturation requires lymphotoxin and TNF signalling. FDC express high levels of complement receptor 1 (CR1; also known as CD35) and CR2 (CD21), which are essential for Ag retention (Heesters et al., 2014).

PATHOLOGICAL RELEVANCE

Allergic contact dermatitis

Allergic contact dermatitis (ACD) is a common inflammatory skin disease in humans with a prevalence of 15–20% in the general population. ACD is classified as a delayed hypersensitivity reaction that occurs after skin exposure to contact sensitizers, also known as haptens, and involving dendritic cells (DC) (Martin et al., 2011). It is characterized by redness, papules and vesicles and followed by scaling and dry skin. The physiopathology of ACD studied in the mouse model is referred as contact hypersensitivity (CHS). ACD is composed of two phases: the clinically silent sensitization

phase and the inflammatory elicitation phase. Innate immune cells including DC play a major role in the initiation of the Ag-specific primary immune response during the initial phase of sensitization. The sensitization phase occurs when the contact sensitizer penetrates the epidermis whereas the elicitation phase is responsible for the recruitment of specific T cells at the site of hapten application. It occurs upon a re-exposure with the same hapten or hapten having similar structural (Christensen and Haase, 2012; Martin et al., 2011; Popov et al., 2012).

Epidermal LC and DDC in the skin capture the contact sensitizer and migrate to skin-draining LN under the influence of inflammatory cytokines like IL-1 β and TNF- α , generated in the skin following hapten application. In draining LN, DC present haptenated peptides bound to MHC-I or MHC-II molecules to naïve hapten-specific CD8 and CD4 T cells, respectively, leading to their activation and proliferation (Popov et al., 2012). This leads to the generation of skin-homing CD8⁺ T-cytotoxic (Tc) 1/Tc17 and CD4⁺T-helper type (Th) 1/Th17 effector T cells that enter blood circulation. Upon re-exposure of the skin, the contact sensitizer triggers a cascade of events resulting in the infiltration of monocytes, neutrophils, and effector T cells. Specific T cells recruited in the skin produce Th1 and Th17 cytokines that include IFN- γ and IL-2, and IL-17, respectively, 24 h after the challenge (Martin et al., 2011).

Psoriasis

Psoriasis is a common, chronic inflammatory skin disease that affects 2–3% of the Caucasian population and is characterized by sharply demarcated, scaly, red plaques with well-defined borders and silvery-white dry scale, located on elbows, knees, and scalp and in the lumbosacral area. Psoriasis vulgaris is the most common type of psoriasis (Chu et al., 2011; Lowes et al., 2014).

Effector cells of both the innate and the adaptive immune system, including keratinocytes, DC and T cells have been shown to play a role in the dysregulation of immune response in psoriasis. Excessive keratinocyte proliferation and reduced differentiation lead to a thickened of the skin (acanthosis) as the keratinocytes move through the epidermis over 4–5 days, a tenfold acceleration; an elongation of the epidermis into the papillary dermis (papillomatosis); a loss of the normal granular layer; a thickened *stratum corneum* (hyperkeratosis) and a retention of the nucleus in the

stratum corneum (parakeratosis) (Lowes et al., 2014). Moreover, dilated dermal blood vessels are responsible of the red color of psoriatic skin lesions. These dermal blood vessels contain leukocytes that are recruited in the epidermis and the dermis. Indeed, neutrophils and CD8⁺ T cells are found in the epidermis, while pDC, myeloid DDC, and CD4⁺ T cells, mainly Th1 and Th17, are found in the dermis. In psoriasis, myeloid DDC include Tip-DC and slanDC (Lowes et al., 2014).

A key pro-inflammatory cytokine in psoriasis, mainly produced by DDC, is IL-23. This cytokine is highly expressed in psoriatic skin lesions and is down-regulated following successful treatments. Furthermore, DDC from psoriatic skin lesions unlike normal skin activates LT to produce pro-inflammatory cytokines, IL-17 and IFN- γ (Chu et al., 2011).

Atopic dermatitis

Atopic dermatitis (AD) is one of the most frequent chronic inflammatory skin diseases with increasing prevalence, affecting 10-20% of children and 1-3% of adults in industrialized countries. Acute AD is characterized by eczematous patches and plaques, epidermal edema (spongiosis) and prominent cellular infiltrate in the dermis. In chronic phase, plaques are lichenified, the epidermis is thickened and its upper layer becomes hypertrophied. Genetic mutations in filaggrin (FLG), which contribute to the keratin cytoskeleton, have been shown in AD. Such epidermal-barrier dysfunction allows the penetration in the skin of allergens such as food allergens, house-dust-mite products, pollens, microbes which lead to an inflammatory response mediated by innate and adaptive immune cells. Two skin myeloid DC subsets have been identified to play a key role in the acute and chronic phases of AD: LC and IDEC (Chu et al., 2011; Gros and Novak, 2012).

An important feature of the pathogenesis of AD is the high-density of Fc ϵ RI on LC allowing to bind to IgE molecules. LC can internalize and present allergens specific for the IgE molecules and leading for the induction of Th2 type response. This Th2 response is characterized by the increase of IgE production and the induction of typical Th2 cytokines like IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 (Wollenberg and Feichtner, 2013).

In the acute phase of AD, it has been shown that Th2-associated cytokines predominate whereas a mixed Th1/Th0 cytokine profile, including IL-2, IL-4 and IFN- γ , characterizes the chronic phase of the disease. Besides Th1 and Th2 cells, increased numbers of Th17

and Th22 cells have been detected in AD skin lesions. Furthermore, IL-25-producing DC were identified in the dermis of AD patients. IL-25 has been shown to inhibit FLG synthesis in primary keratinocytes *in vitro* (Gros and Novak, 2012). Another aspect of lesional skin of both acute and chronic AD is the high level of thymic stromal lymphopoietin (TSLP), an IL-7-like cytokine produced by AD keratinocytes. TSLP is known to induce Ag-independent maturation of DC, to maintain their survival and to induce production of many cytokines and chemokines (CCL-24, CCL-17, CCL-22, IL-8 and IL-15) which favor recruitment of Th2 cells in inflammatory sites (Chu et al., 2011).

INTERACTIONS WITH OTHER PROCESSES AND DRUGS

Immunotherapy by DC vaccination

Vaccines are usually injected subcutaneously or intramuscularly in the skin. Studies performed to characterize human DC subsets provide a novel approach of vaccines therapy. Two main approaches comprise DC-based vaccines: *ex vivo* generated DC vaccines and DC targeting. *Ex vivo* generated DC represent a vaccine therapy to cancer patients with metastasis. DC targeting represents a vaccine approach to deliver Ag directly to DC *in vivo* using proteins composed of an anti-DC receptor antibody and an antigen. Both LC and DDC are known to be implicated in this therapy (Palucka and Banchereau, 2012).

It has been demonstrated that vaccine adjuvants induce the maturation of DC, which leads to antigen processing and presentation. Many TLR agonists [Polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C, TLR3 agonist), Monophosphoryl lipid A (MPLA, TLR4 agonist), CpG oligodeoxynucleotide (ODN, TLR9 agonist) and Resiquimod/R848 (TLR7/8 agonist)] have been administered with vaccines to activate DC (Sehgal et al., 2014).

Targeting DC through DEC-205, an endocytic receptor abundantly expressed by lymphoid DC, in the presence of adjuvants (TLR3, TLR7/8 or CD40 ligands) trigger an immune protection against pathogens [human immunodeficiency virus (HIV) and tuberculosis] and cancer. Targeting DC through other membrane receptors like CLEC9A, Dectin-1, DC-SIGN, DCIR, and Langerin with adjuvants lead to cellular and humoral immune responses (Sehgal et al., 2014).

In this context, the co-administration of adjuvants with anti-DEC antibody fused with the tumor Ag induce antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells responses which lead to the activation of targeted DC (Klechevsky and Banchereau, 2013).

Recently, the vaccine CDX-1401, a human anti-DEC-205 monoclonal antibody with a fusion protein composed of the full-length tumor antigen, NY-ESO-1, has been tested in a phase I clinical trial. The intracutaneous injection of this vaccine was co-administered, topically or subcutaneously, with the TLR7/8 agonist, resiquimod, and the TLR3, poly-ICLC also called Hiltonol, generate a potent humoral and cellular immune response against NY-ESO-1 resulting in tumor cell lysis (Sehgal et al., 2014).

Other studies using human skin DC subsets suggest that LC can induce a robust antigen-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response. Indeed, anti-DCIR antibody fused with Ag targeting LC showed that these targeted LC efficiently cross-present to CD8⁺T cells leading to their proliferation and the activation of the immune system (Klechevsky and Banchereau, 2013).

Immunotherapy by anti-cytokine

Several therapeutic approaches targeting the pro-inflammatory cytokines produced by DC, like TNF- α , IL-12/23p40 and IL-23p19, have been suggested to treat psoriasis. These therapies includes the anti-TNF- α treatment involving etanercept (Enbrel®), a soluble Fc fusion protein of the human p75 TNF-receptor; infliximab (Remicade®), a chimeric monoclonal antibody (mAb) raised against TNF- α and adalimumab (Humira®), a fully human monoclonal anti-TNF antibody. It has been described that treating psoriatic patients with etanercept lead to a decrease number of DDC and their downstream pro-inflammatory cytokines like IL-20, IL-12/23p40, IL-20, IL-23p19 and iNOS. It has also been shown that two weeks after the treatment with etanercept, DDC down-regulated the expression of CMH-II, CD83, CD86 and DC-LAMP (dendritic cell-lysosomal-membrane-associated protein), a DC maturation marker (Chu et al., 2011; Kupetsky et al., 2013 ; Nograles and Krueger, 2011).

IL-23 targeting, another anti-psoriatic treatment which reacts with DC, has also been developed. It includes two anti IL-12/IL-23p40 mAbs: briakinumab (Ozespas[®]) and ustekinumab (Stelara[®]) and the IL-12 and IL-23 inhibitor: Apilimod mesylate (STA-5326[®]). Both briakinumab and ustekinumab are, human IgG1 mAbs, bind to the p40 subunit of human IL-12 and IL-23, and prevent its interaction with IL-12Rb1. Ustekinumab blocks the signaling of IL-12 and IL-23 by targeting IL-12/23p40 subunit. However, Apilimod is known as an inhibitor of the nuclear accumulation of c-Rel, a transcription factor that regulates the expression of the IL-23 p19, the IL-12 p35 and the IL-12/23 p40 subunits (Chu et al., 2011 ; Kupetsky et al., 2013 ; Nogales and Krueger, 2011). All these therapies are used for treating moderate to severe psoriasis through modulating DC activation.

Immunotherapy by fumaric acid esters

Since the late 1950s, fumaric acid esters (FAE) have been used for treating psoriasis. They were first discovered by the German chemist Schreckendie who had psoriasis. FAE act on the immune response and inhibit the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-12 and IL-23 (Rostami-Yazdi et al., 2010; Walker et al., 2014; Wollina, 2011).

The drug Fumaderm[®] has been approved in Germany since 1994 as a systemic therapy of severe psoriasis. Fumaderm[®] is a mixture of dimethylfumarate (DMF) and three salts of monoethylfumarate (MEF). To obtain an anti-psoriatic effect, FAE should be taken orally because the topical application has no anti-psoriasis activity (Walker et al., 2014). It has been shown that MMF modulates DC polarization leading DC to down-regulate the production of pro-inflammatory IFN- γ by T cells. MMF and DMF inhibited the differentiation of monocyte-derived DC resulting in less effective cells in stimulating Th1 cytokines than Th2 cytokines (Wollina, 2011).

Another particular feature of DMF is the activation of different signaling pathways. Among them, DMF induces the activation of the transcription factor Nrf2 (nuclear factor-2 related factor 2). The following interaction between the heme oxygenase-1 (HO-1) and NF- κ B activity leads to a suppression of IL-12 and IL-23 production by DC treated with DMF. HO-1 is a downstream target gene of Nrf2 and a stress-response protein. This immune dysregulation prevents the development of Th1/Th17 cells and triggers

IL-4-producing Th2 cells. DMF is also known to regulate IL-23, a crucial pro-inflammatory cytokine for the development of psoriasis (Walker et al., 2014).

CROSS-REFERENCES

Allergic contact dermatitis

Psoriasis

Atopic dermatitis

Vaccines

Haptens, contact sensitizers

REFERENCES

- Banchereau, J., and R.M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
- Bangert, C., P.M. Brunner, and G. Stingl. 2011. Immune functions of the skin. *Clinics in dermatology* 29:360-376.
- Bobr, A., I. Olvera-Gomez, B.Z. Igyarto, K.M. Haley, K.A. Hogquist, and D.H. Kaplan. 2010. Acute ablation of Langerhans cells enhances skin immune responses. *Journal of immunology* 185:4724-4728.
- Christensen, A.D., and C. Haase. 2012. Immunological mechanisms of contact hypersensitivity in mice. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 120:1-27.
- Chu, C.C., P. Di Meglio, and F.O. Nestle. 2011. Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. *Semin Immunol* 23:28-41.
- Coquerelle, C., and M. Moser. 2010. DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunol Rev* 234:317-334.
- Gros, E., and N. Novak. 2012. Cutaneous dendritic cells in allergic inflammation. *Clin Exp Allergy* 42:1161-1175.
- Guilliams, M., F. Ginhoux, C. Jakubzick, S.H. Naik, N. Onai, B.U. Schraml, E. Segura, R. Tussiwand, and S. Yona. 2014. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* 14:571-578.
- Gunther, C., J. Starke, N. Zimmermann, and K. Schakel. 2012. Human 6-sulfo LacNAc (slan) dendritic cells are a major population of dermal dendritic cells in steady state and inflammation. *Clinical and experimental dermatology* 37:169-176.
- Haniffa, M., M. Gunawan, and L. Jardine. 2014. Human skin dendritic cells in health and disease. *J Dermatol Sci*
- Haniffa, M., A. Shin, V. Bigley, N. McGovern, P. Teo, P. See, P.S. Wasan, X.N. Wang, F. Malinarich, B. Malleret, A. Larbi, P. Tan, H. Zhao, M. Poidinger, S. Pagan, S. Cookson, R. Dickinson, I. Dimmick, R.F. Jarrett, L. Renia, J. Tam, C. Song, J. Connolly, J.K. Chan, A. Gehring, A. Bertoletti, M. Collin, and F. Ginhoux. 2012. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* 37:60-73.
- Heesters, B.A., R.C. Myers, and M.C. Carroll. 2014. Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nat Rev Immunol* 14:495-504.
- Hoeffel, G., Y. Wang, M. Greter, P. See, P. Teo, B. Malleret, M. Leboeuf, D. Low, G. Oller, F. Almeida, S.H. Choy, M. Grisotto, L. Renia, S.J. Conway, E.R. Stanley, J.K. Chan, L.G. Ng, I.M. Samokhvalov, M. Merad, and F. Ginhoux. 2012. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med* 209:1167-1181.
- Klechevsky, E., and J. Banchereau. 2013. Human dendritic cells subsets as targets and vectors for therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1284:24-30.
- Kupetsky, E.A., A.R. Mathers, and L.K. Ferris. 2013. Anti-cytokine therapy in the treatment of psoriasis. *Cytokine* 61:704-712.
- Lowes, M.A., M. Suarez-Farinas, and J.G. Krueger. 2014. Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol* 32:227-255.
- Malissen, B., S. Tamoutounour, and S. Henri. 2014. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nat Rev Immunol* 14:417-428.

- Martin, S.F., P.R. Esser, F.C. Weber, T. Jakob, M.A. Freudenberg, M. Schmidt, and M. Goebeler. 2011. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy* 66:1152-1163.
- Matzinger, P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12:991-1045.
- Merad, M., P. Sathe, J. Helft, J. Miller, and A. Mortha. 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 31:563-604.
- Nogralles, K.E., and J.G. Krueger. 2011. Anti-cytokine therapies for psoriasis. *Experimental cell research* 317:1293-1300.
- Palucka, K., and J. Banchereau. 2012. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature reviews. Cancer* 12:265-277.
- Popov, A., I. Mirkov, and M. Kataranovski. 2012. Inflammatory and immune mechanisms in contact hypersensitivity (CHS) in rats. *Immunologic research* 52:127-132.
- Pradeu, T., and E.L. Cooper. 2012. The danger theory: 20 years later. *Front Immunol* 3:287.
- Rostami-Yazdi, M., B. Clement, and U. Mrowietz. 2010. Pharmacokinetics of anti-psoriatic fumaric acid esters in psoriasis patients. *Archives of dermatological research* 302:531-538.
- Saei, A., and J. Hadjati. 2013. Tolerogenic dendritic cells: key regulators of peripheral tolerance in health and disease. *International archives of allergy and immunology* 161:293-303.
- Schraml, B.U., and E.S.C. Reis. 2014. Defining dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 32C:13-20.
- Scott, C.L., S. Henri, and M. Williams. 2014. Mononuclear phagocytes of the intestine, the skin, and the lung. *Immunol Rev* 262:9-24.
- Sehgal, K., K.M. Dhodapkar, and M.V. Dhodapkar. 2014. Targeting human dendritic cells in situ to improve vaccines. *Immunology letters* 162:59-67.
- Sparber, F. 2014. Langerhans cells: an update. *J Dtsch Dermatol Ges* 12:1107-1111.
- Steinman, R.M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-296.
- Steinman, R.M. 2012. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol* 30:1-22.
- Tay, S.S., B. Roediger, P.L. Tong, S. Tikoo, and W. Weninger. 2014. The Skin-Resident Immune Network. *Current dermatology reports* 3:13-22.
- Toebak, M.J., S. Gibbs, D.P. Bruynzeel, R.J. Scheper, and T. Rustemeyer. 2009. Dendritic cells: biology of the skin. *Contact Dermatitis* 60:2-20.
- Walker, F., A. Adamczyk, C. Kellerer, K. Belge, J. Bruck, T. Berner, K. Merten, N. Nunez Gomez, M. Neureither, M. Rocken, K. Ghoreschi, and g. Study. 2014. Fumaderm(R) in daily practice for psoriasis: dosing, efficacy and quality of life. *The British journal of dermatology* 171:1197-1205.
- Wilsmann-Theis, D., S. Koch, C. Mindnich, S. Bonness, S. Schnautz, D. von Bubnoff, and T. Bieber. 2013. Generation and functional analysis of human TNF-alpha/iNOS-producing dendritic cells (Tip-DC). *Allergy* 68:890-898.
- Wollenberg, A., and K. Feichtner. 2013. Atopic dermatitis and skin allergies - update and outlook. *Allergy* 68:1509-1519.
- Wollina, U. 2011. Fumaric acid esters in dermatology. *Indian dermatology online journal* 2:111-119.

Résumé

L'eczéma allergique de contact (EAC) est une réaction inflammatoire aiguë médiée par les lymphocytes T (LT), survenant suite à l'exposition répétée de la peau avec une molécule allergisante présente dans l'environnement quotidien ou professionnel. Les molécules allergisantes sont des composés de faible poids moléculaire, appelés haptènes, qui activent les cellules dendritiques (DC). Les DC jouent un rôle essentiel dans la mise en place d'un EAC : elles acquièrent un phénotype mature, contrôlé par la voie des MAPK et la voie NF- κ B, leur permettant de présenter l'haptène aux LT afin d'initier ainsi une réponse immunitaire spécifique.

Nous avons identifié au sein de la DC une nouvelle kinase, la protéine kinase CK2, indispensable à l'acquisition d'un phénotype mature et à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires clés dans l'orientation d'une réponse immunitaire. L'activité de la CK2 dans la DC est nécessaire à la génération d'une réponse Th1 en contrôlant la sécrétion d'IFN γ par les LT, et maintient une réponse Th17 préexistante. De plus, la CK2 permet à la DC de contrôler l'induction d'une réponse Th2 spontanée.

Par ailleurs, la CK2 contrôle l'expression des gènes cibles de Nrf2, un facteur de transcription majeur dans la lutte contre le stress chimique induit par les haptènes. L'activation de Nrf2 met en jeu de nombreuses voies de signalisation, et nous avons mis en évidence c-Jun, facteur de transcription activé par les molécules allergisantes, comme un potentiel partenaire transcriptionnel de Nrf2.

Mots Clés : Eczéma allergique de contact, Immunité cutanée, Cellules dendritiques, Molécules allergisantes, Protéine kinase CK2, Lymphocytes T, Nrf2, Voies de signalisation

PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

Laboratoire de rattachement :

INSERM UMR-S 996 « Inflammation, Chimiokines et Immunopathologie »

Equipe2 : Allergies aux médicaments et produits chimiques, Immunotoxicologie, Immunopathologie

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »

5, rue Jean Baptiste Clément

92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex